



저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

의학 박사학위논문

내독소 유발 패혈증 마우스 모델에서
항염증 물질인 헤모펙신의 효과

**Effect of hemopexin as an anti-inflammatory
mediator on endotoxemic mouse model; a
new property of the protein**

2017년 08월

서울대학교 대학원
의학과 응급의학 전공
정 재 윤

요약 (국문 초록)

서론: 패혈증은 전 세계적으로 높은 사망률을 가지고 있는 질환으로 암, 급성 심장사 등에 이은 중요한 사망 원인 중의 하나로 사회, 경제적으로 큰 손실을 유발하고 있다. 최근 연구에 의하면 패혈증 시에 용혈 반응이 광범위하게 일어나며, 용혈 반응을 통해 생성된 헴 (heme)에 의해 산화 반응과 염증 반응이 가속화되고 결과적으로 심한 조직 손상을 일으킨다고 알려져 있다. 헤모펙신 (hemopexin, HPX)은 유리 헴 (free heme)을 혈중 및 조직에서 포함하여 간세포 내로 이동시킨 후 제거하는 청소(scavenger) 단백질로서 헴에 의한 염증 반응을 줄여줄 수 있는 후보물질로 최근 주목받고 있다. 하지만 아직 패혈증이나 내독소혈증(endotoxemia)에서 헤모펙신의 역할이 명확하게 밝혀지지 않고 있다. 본 연구에서는 내독소혈증을 유발한 마우스 모델에서 항염증 효과를 보일 것으로 기대되는 헤모펙신의 투여가 마우스의 전신 및 폐조직의 염증 반응을 감소시키는지 알아보았다.

방법: 수컷 마우스(20-23g)에 lipopolysaccharide (LPS)를 정맥을 통하여 주입하여 내독소혈증을 유발하였다. LPS의 양은 사전 실험을 통하여 75%의 사망률을 보이는 10 mg/kg 의 용량을 사용하였고, 향후 투여할 헤모펙신 (hemopexin, HPX) 용량은 기존 연구를 참고하여 5 mg/kg로 결정하였다.

대조군, LPS군 (LPS treated only), LPS+HPX군 (HPX supplement after LPS-treated)의 세 군으로 나누어 생존 실험을 진행하였다. 대조군의 경우 복강 내로 생리식염수, 정맥으로 증류수를 투여하였다. 나머지 군들은 마우스의 복강 내로 LPS를 투여하여 내독소혈증을 유발한 후 30분 후에 정맥으로 증류수 (LPS군), 헤모팩신 (LPS+HPX군)을 투여하였다. 이후 36시간 동안 생존 여부를 관찰하였다. 또 다른 실험으로 생존 실험과 같은 환경 및 조작을 가하고 세 군에서 0시간, 3시간, 6시간에 마우스를 심장채혈을 통해 희생시킨 후 혈중 tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) 및 HPX 농도를 시간대 별로 측정하였다. 또한 폐조직을 분리하여 0시간, 3시간, 6시간 시점의 cytoplasmic inhibitor κ B- α (I κ B- α), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and the NF- κ B의 p65 subunit (NF- κ B p65)를 측정하고 6시간 후 각 군의 조직학적 특성을 Haematoxylin and eosin 염색과 폐 손상 점수를 통해 비교하였다. 각 항목의 시간에 따른 변화 분석은 one-way repeated measured analysis of variance 방법으로 비교하였고 시간대별 각 군의 차이에 대한 분석은 Mann-Whitney U post hoc test with Bonferroni correction 방법을 사용하여 분석하였다.

결과: 생존실험 결과 대조군은 모두 생존하였으며 LPS군은 63.6%,

LPS+HPX군은 9.1%의 사망률을 보여 LPS군에 비해 LPS+HPX 군이 유의하게 사망률이 낮았다. ($p < 0.05$) 혈중 TNF- α 와 IL-6 는 3시간과 6시간에 LPS+HPX 군에서 LPS군에 비해 유의하게 낮은 결과를 보였다. ($p < 0.05$) 또한 LPS군에 비해 LPS+HPX군의 cytoplasmic p-I κ B- α , NF- κ B p65 expression은 LPS군에 비해 유의하게 증가되었다. ($p = 0.017$) NF- κ B p65 binding activity와 cytoplasmic p-I κ B- α 대 I κ B- α ratio 역시 LPS+HPX군에서 LPS군에 비해 유의하게 낮았다. ($p = 0.002$) 6시간째 조직학적 결과 및 폐 손상 점수에서도 LPS군에 비해 LPS+HPX군에서 유의하게 폐 손상이 적은 결과를 보여주었다.

결론: 내독소혈증을 유발한 마우스 모델에서 헤모팩신의 주입은 전신 염증 반응을 줄이고 폐조직에서 폐 손상을 줄여 주며 생존율을 증가시켰다. 이 효과는 NF- κ B pathway의 억제와 밀접한 관련이 있을 것으로 판단된다.

주요어: 헤모팩신, 헴, 내독소혈증, NF- κ B pathway, 폐 손상

학번: 2012-30526

목 차

초록	i
목차	iv
List of Tables	vii
List of Figures	viii
List of abbreviations and symbols	x
서론	1
1. 연구 배경	1
1) 패혈증의 현황 및 문제점	1
2) 패혈증의 알려진 기전과 염증 반응	2
3) Nuclear kappa B pathway	5
4) 패혈증에서의 폐 조직손상	8
5) 패혈증 환자의 치료 방침 및 문제점	9
6) 패혈증에서 free heme(헴)의 역할	10
7) 헤모펙신(hemopexin) 및 역할	12
2. 필요성	14

3. 연구 가설	15
----------------	----

4. 연구 목적	17
----------------	----

연구 재료 및 방법	18
------------------	----

1. 연구 재료	18
----------------	----

1) 실험동물의 획득과 순화 과정	18
--------------------------	----

2) 실험군 설정	19
-----------------	----

3) 실험약 설정	19
-----------------	----

2. 연구 방법	20
----------------	----

1) 실험동물의 마취와 준비	20
-----------------------	----

2) 내독소혈증 유도 및 생존실험	20
--------------------------	----

3) 내독소혈증 유도 및 헤모팩신 보충 실험.....	21
-------------------------------	----

4) 헤모팩신 투여량의 결정	25
-----------------------	----

3. 결과지표의 측정	26
-------------------	----

1) 검체 채취	26
----------------	----

2) Enzyme-linked immunosorbent assays	26
---	----

3) 폐조직의 획득	27
------------------	----

4) Western blot analysis and NF- κ B binding activity	27
--	----

5) 병리조직학적 결과의 측정	29
------------------------	----

4. 결과의 분석	32
-----------------	----

연구 결과	33
1. 생존율 결과	33
2. 혈중 헤모펙신 및 염증 cytokine 농도 측정 결과	34
1) Serum hemopexin level	34
2) Tumor necrosis factor alpha level	37
3) Interleukin 6 level	39
4. Tissue assay and Western blot 결과	41
1) Western blot 결과	41
2) Nuclear factor kappa-B transcription factor assays	45
5. 병리 조직학적 결과	47
1) Haematoxylin and eosin stain	47
2) Lung injury score	49
고찰	51
결론	59
참고문헌	59
초록 (영문)	65

List of Tables

Table 1.Lung injury scoring system	31
--	----

List of Figures

Figure 1. Mechanisms and pathophysiology of sepsis	4
Figure 2. Mechanisms of nuclear kappa B pathway activation	7
Figure 3. Possible protection mechanism of hemopexin from endotoxemia	16
Figure 4. Survival experiments.	23
Figure 5. Diagram of experiments to examine the protective effects of hemopexin	24
Figure 6. Kaplan–Meier survival curves	32
Figure 7. Serum levels of hemopexin.....	35
Figure 8. Serum levels of tumor necrosis factor alpha.....	37
Figure 9. Serum levels of interleukin–6.....	39
Figure 10. Cytoplasmic expression levels of phosphorylated IκB– α.....	41
Figure 11. Cytoplasmic expression levels of IκB–α.....	42
Figure 12. Cytoplasmic expression levels of NF–κB p65.....	43
Figure 13. The DNA binding activity of NF–κB in lung tissues at 6 h	

after LPS treatment.....	45
Figure 14. Histologic evaluations of lung tissues.....	47
Figure 15. Injury scores of lung tissues.....	49

List of abbreviations and symbols

NF- κ B	Nuclear factor kappa B
TNF- α	Tumor necrosis factor alpha
IL-6	Interleukin-6
LPS	Lipopolysaccharide
HPX	Hemopexin
ELISA	Enzyme-linked immunosorbent assays
SPF	Specific pathogen free
p-I κ B- α	Phosphorylated inhibitors kappa B alpha
I κ B	Inhibitors kappa B

서론

1. 연구 배경

1) 패혈증의 현황 및 문제점

패혈증은 최근에 조직 손상을 유발하는 감염증 및 염증 반응으로 재 정의되고 있다. (1, 2) 전 세계적으로 여러 가지 통계에 의하면 패혈증으로 사망하는 환자가 심장 발작이나 혹은 뇌졸중으로 사망하는 환자에 비해서 많다고 알려져 있다. (3) 이런 결과에도 불구하고 아직 패혈증은 다른 사망을 유발하는 주요 질환보다 중요시되지 않고 있다. 미국의 한 통계에 의하면 패혈증은 1,000명 인구 당 3명에서 발생하는 것으로 보고되고 있고, (4) 심혈관계통의 사망환자를 제외하고 중환자실에서 가장 흔한 사망 원인으로 보고되고 있다. (5) 패혈증을 극복하기 위한 수년간의 노력의 일환으로 패혈증의 빠른 인지 및 표준화된 응급실 치료 방침의 설정, 전파 노력으로 인하여 패혈증의 사망률은 점점 감소하는 추세이나 (6-10) 지난 수십 년간 패혈증 환자의 사망률은 30% 내외에서 유지되고 있으며(11, 12) 최근 발표된 내용에 의하면 85% 이상의 패혈증 환자들이 제대로 치료를 받지 못하고 있는 것으로 알려져 있다. (13)

2) 패혈증의 알려진 기전과 염증 반응

패혈증의 기전 및 병태 생리는 생체에 침입한 미생물에 대한 조직의 염증 반응에서 시작되어, 이후 신체의 과도한 면역 반응이 전신적으로 나타나면서 개체에 치명적인 해를 입히는 것으로 이해되고 있다. (14) 아직 중증 패혈증이나 패혈증 쇼크에 대한 정확한 기전은 아직 알려지지 않았지만, 일반적으로 미생물의 침입 후에 발생하는 우리 신체 내의 여러 가지 반응 중에 대표적으로 3가지 반응이 주요한 기전이라고 알려져 있다. 첫 번째로는 보체 (complement)의 활성화이며, 두 번째로는 응고반응 활성화, 마지막으로 Nuclear factor kappa B pathway (NF- κ B)가 활성화가 주된 기전으로 알려져 있다. 이 중에서 특히 NF- κ B pathway의 활성화는 대식세포와 monocyte 및 Granulocyte를 migration하고, 이런 염증 세포의 활성화를 통해서 Tumor necrosis factor- α (TNF- α) 및 Interleukin-6 (IL-6) 등의 염증성 cytokine의 분비, 활성산소기 분비, Protease, Lipid mediators, Vasoactive factor 분비를 촉진하여, 미세 혈관의 혈관 투과성 증가 및 조직 손상을 유발하는 것으로 알려져 있다. (2) (Figure 1)

고유한 면역 반응의 활성화는 체내에 침입한 세균의 제거에는 유리하게 작용하나, 동반되어 분비되는 pro-inflammatory mediator에 의하여 역설적으로 우리 신체는 염증 반응이 조절되지 않는 상태로 변하게 된다.

(dysregulated inflammation) (15, 16) 조절되지 않는 염증반응은 결과적으로 폐, 심장, 신장 등 필수적인 조직의 손상 (17) 을 유발하게 되며 이 과정을 우리 신체가 극복하지 못하게 되면 사망에 이르게 된다.

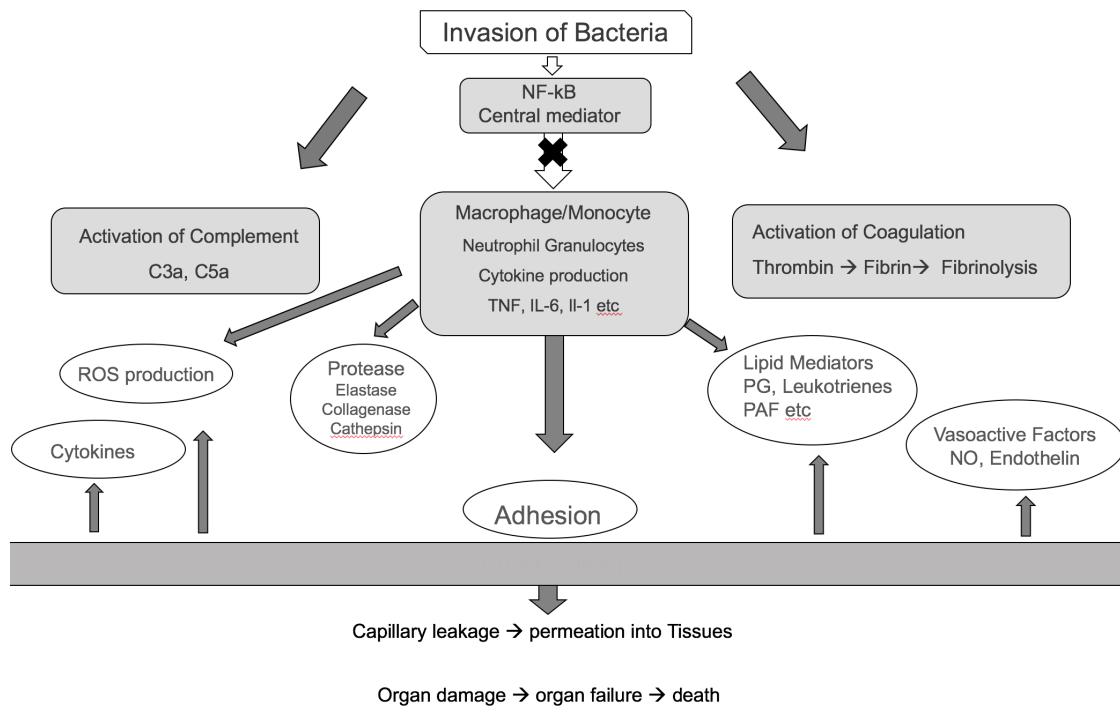


Figure 1. Mechanisms and pathophysiology of sepsis

3) Nuclear kappa B pathway

Nuclear factor kappa B (NF- κ B) transcription factor는 우리 고유 면역 체계에서 inflammatory cytokine을 포함하여 chemokine이나 adhesion molecule 등의 표현을 조절하는 물질로 잘 알려져 있다. 따라서 NF- κ B transcription factor가 비정상적으로 조절 되는 상황이 초래하게 되면 우리 신체에서 각종 염증 반응이 촉발하게 된다. NF- κ B는 DNA transcription을 조절하고 cytokine의 생성 및 세포 생존을 조절하는 단백질 복합체로 구성되어 있다. NF- κ B 단백질 복합체는 세균 감염 및 바이러스 감염 등 모든 종류의 감염에 반응하여 면역체계를 조절하는 역할을 하며, NF- κ B가 비정상적으로 조절되는 임상적 상황은 암, 염증 반응, 자가면역질환, 패혈증, 세균 감염 등이 있다. NF- κ B pathway의 활성화는 감염이나 패혈증 등의 상황에서 신호가 세포 표면에 있는 수용기를 자극하면 Inhibitors kappa B (IkB) 단백질이 분해되면서 시작된다. 원래 정상적인 상황에서 IkB는 NF- κ B dimer를 cytoplasm 내에서 작동하지 못하게 꼭 잡고 있는 역할을 한다. 하지만 세포가 수용기를 통해서 자극되면 IkB kinase (IKK)가 활성화되어 IkB를 인산화시켜 NF- κ B를 붙잡고 있던 IkB가 NF- κ B에서 떨어져 나가게 하여 NF- κ B의 자유로운 활동이 가능해진다. 자유로워진 NF- κ B는 이후 세포 핵 내로 반입되고 핵 내에서 RNA polymerase 및 co-activator와 결합한

후 DNA에 작용하여 각종 염증 프로세스를 담당하는 유전자를 과도하게 발현시키고 염증세포에서 과도한 염증성 cytokine이 분비되어 결과적으로 염증 반응을 폭발적으로 일으키게 된다. (18) (Figure 2)

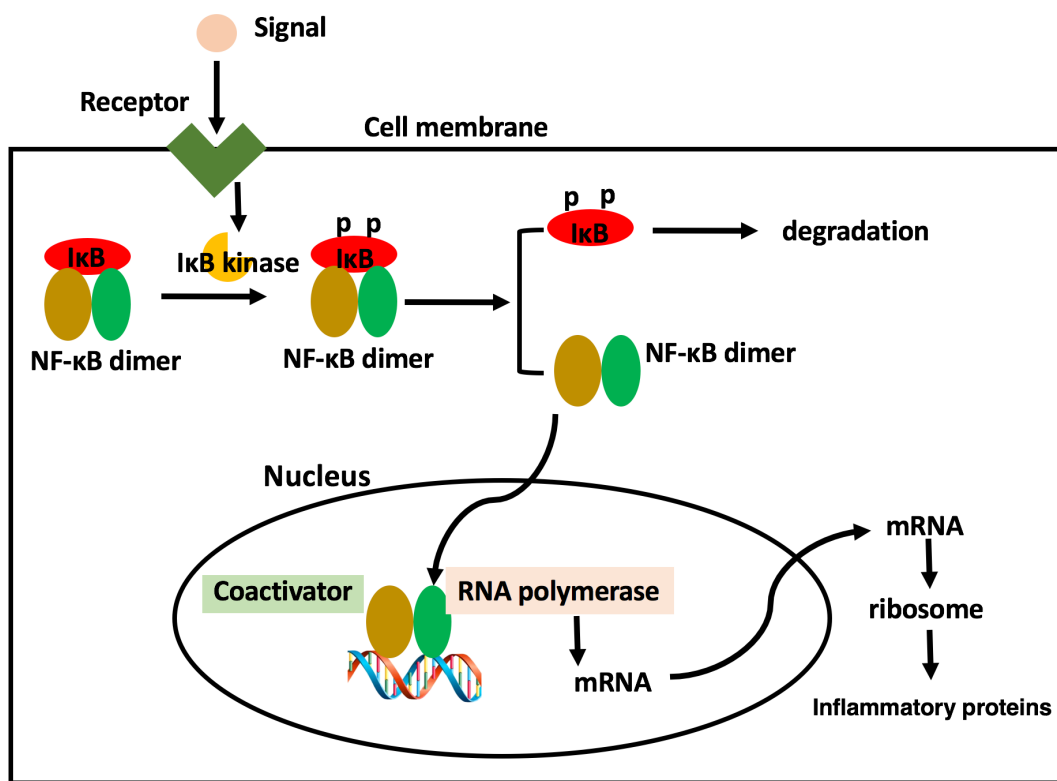


Figure 2. Mechanism of nuclear kappa B pathway activation

3) 패혈증 및 내독소혈증에서의 폐조직 손상

패혈증에서 조절되지 않는 염증반응 (dysregulated inflammation)은 다양한 장기에 영향을 미치고 결과적으로 다발성 장기부전 (Multi-organ failure)을 유발하게 된다. 그중에서도 폐 실질 조직 손상에 대한 여러 연구 보고들이 있다. 패혈증으로 인하여 유발되는 폐 실질 조직의 광범위한 염증 반응은 급성 폐 손상을 초래하게 되며 결과적으로 급성 호흡 부전을 일으킨다고 알려져 있다. (2, 16, 19) 패혈증에 의한 급성 폐 손상에서는 다양한 기전이 작용할 수 있겠으나, 대표적으로는 폐혈관 내피세포에 염증 반응 물질들이 결합하여 비정상적인 혈관 확장이 일어나고 이러한 비정상적인 혈관 확장이 폐조직의 관류 상태를 악화시키고 각종 염증세포의 축적을 유발한다고 알려져 있다. (16) 이러한 패혈증에서 급성 폐 손상을 일으키는 핵심적인 기전에서 NF- κ B pathway가 중요한 역할을 한다고 알려져 있으며, NF- κ B pathway와 관련된 급성 폐 손상은 유리/자유 헴 (free heme)과 연관성이 있으며 이는 내독소혈증을 유발하여 진행된 실험 연구에서 일부 확인되었고 (20, 21), 실제 폐혈관 내피세포의 손상이 내독소혈증으로 유발된 급성 폐 손상에서 유리/자유 헴과 관련된 산화 스트레스에 의해 유발된다는 것도 실험을 통하여 알려져 있다. (22)

4) 패혈증 환자의 치료 방침 및 문제점

패혈증 및 중증 패혈증을 치료하기 위한 노력은 과거부터 현재까지 꾸준히 이루어지고 있다. 각종 연구 결과들을 바탕으로 패혈증과 패혈증 쇼크를 치료하기 위한 치료 지침이 개발되었고 현재까지 지속해서 적용되고 있다. 이 치료 지침에서 패혈증 치료의 핵심은 ‘감염원의 제거’, ‘염증성 물질의 제거 혹은 반응차단’ 및 ‘조직 관류의 유지’이며, 이를 위해 패혈증의 정확한 정의 수립과 조직 관류 유지를 위한 수액 치료, 승압제의 사용 및 기타 염증 물질 차단을 위한 각종 치료 방법이 제안되고 있다. (23) 이 중에서 염증성 매개 물질의 제거 혹은 차단을 위한 여러 전 임상 연구들의 효과를 바탕으로 임상 연구가 진행되었으나 전 임상연구와는 달리 임상연구에서는 일시적인 효과는 있으나 복잡한 염증 반응 과정 자체를 회복시키거나 조직 관류를 개선하지 못하고 다발성 장기 부전의 진행을 막지 못하여 결과적인 효과를 나타내지는 못하고 있으며 (23, 24), 향후 복잡한 염증 반응을 억제할 수 있는 물질의 발견 및 개발이 시급한 실정이다.

5) 패혈증에서 free heme (자유 헴)의 역할

헴 (heme)은 일반적으로 헤모글로빈 (hemoglobin), 마이오글로빈 (myoglobin), 사이토크롬 (cytochrome)의 합성에 필수 물질로 알려져 있다. 또한 헴은 다양한 세포의 합성 및 물질대사 과정에 중요한 요소로 알려져 있다. (25) 헴은 세포에 산소를 공급하는 데 필수적인 물질로서, 헴을 구성하는 요소로는 철(iron)과 protoporphyrin IX로 구성되어 있다. 헴의 대사 과정은 비교적 잘 알려져 있다. 헴은 세포 수준에서 그 양이 철저히 조절되고 있는데, 헴은 간세포 내에서 합성되어 위에서 언급한 물질의 합성에 주로 사용되고 이후 헤모펙신 (hemopexin)에 의해 혈중에서 포함되어 다시 간세포 내로 이동하여 heme oxygenase 효소 (HO-1)에 의해서 분해되는 일련의 과정을 통해 신체 내에서 조절되고 있다. (26) 알려진 바에 의하면 헴은 세포 내에 있는 경우에는 신체 내에서 별다른 위해 작용을 일으키지 않는다. 하지만 세포 밖으로 헴이 나오는 경우에는 매우 강력한 산화 반응의 전구물질로 변하게 되고 세포 독성 물질로 변하게 된다. 세포 밖의 헴을 유리/자유 헴이라고 하며 유리/자유 헴이 많이 나오는 병적인 상태로는 과다한 용혈 반응이나 패혈증, 내독소혈증 등이 있다. 또한 유리/자유 헴은 각종 염증 물질 및 Toll-like receptor 4 (TLR-4)와 상호 작용을 통해서 신체 내의 면역 반응을 증폭 시키고 백혈구의 활성화와 이동을 촉진해 각종

adhesion molecule과 cytokine을 생성하여 조절되지 않는 면역 반응 (dysregulated inflammation)을 유발하고 특히 폐조직에서는 손상을 촉진시킨다고 잘 알려져 있다. (27-31)

6) 헤모펙신 (hemopexin) 및 역할

헤모펙신 (hemopexin)은 6-KD의 혈장 glycoprotein으로 구성된 우리 체 내에서 네 번째로 많은 혈장 단백질로서 주된 역할은 혈장에서 헴과 결합하여 헴을 간세포 내로 이동하여 제거하는 역할을 가지고 있다. 이런 헤모펙신의 헴에 대한 결합능력은 포화 방식으로 작용하기 때문에, 혈중에서 헤모펙신이 처리할 수 없는 양의 헴이 방출되는 상황에서는 헤모펙신의 양이 감소하기 시작하는데, 이런 현상은 전통적으로 혈관 내 용혈의 심각한 정도를 평가하는 데 주로 사용되었다. 최근 연구에 의하면 헤모펙신은 각종 염증 반응에서 유리/자유 헴을 제거하는 본연의 역할을 통해 항염증 작용과 (30, 31) 폐조직 보호효과 (32-34)를 보인다고 알려져 있다. 또한, 내독소혈증을 유발한 백서 연구 결과, 사망률이 75% 정도 예상되는 내독소혈증을 유발한 백서의 내독소혈증 유발 후 6시간에 측정된 헤모펙신의 농도가 내독소혈증을 유발하지 않은 백서의 헤모펙신 농도에 비해 25%까지 감소함을 보여 주고 있어서 심한 염증 반응에서 유리/자유 헴의 유리와 이를 제거하는 헤모펙신의 항염증 역할에 대해 간접적으로 시사하고 있다. (27) 유리/자유 헴을 제거하는 헤모펙신의 항염증 작용 외에 헤모펙신 자체가 항염증 작용을 한다는 *in vitro* 연구결과도 있다. (30) 이 연구들에 의하면 대식세포에 내독소를 처리하여 자극을 준 경우에 cytokine 농도의 상승을 보이는 염증반응을

보였고 여기에 blood degraded product인 헴을 추가하면 염증반응이 내독소 단독으로 처리한 경우보다 폭발적으로 증가하는 결과를 보였다. 이후 헤모팩신을 추가했더니 대식세포에 내독소와 헴을 추가한 경우뿐만 아니라 대식세포에 내독소만 처리한 경우에도 염증반응이 감소하는 결과를 보여 비단 헤모팩신이 헴을 제거하여 항염증 작용을 하는 것 외에도 헤모팩신 자체에도 항염증 효과가 있음을 시사한 연구 결과를 보여 주었다.

2. 필요성

패혈증 환자의 생존을 위해 표준 치료 지침 제공, 빠른 인지를 위한 노력, 염증성 매개 물질의 차단 등 다양한 노력이 이루어지고 있지만, 패혈증은 여전히 낮은 생존율을 보이며, 치료로 인한 과도한 사회적 비용을 초래하고 있다. 패혈증의 치료를 위해 패혈증을 유발하는 여러 기전 중에서 중요한 단계인 NF- κ B pathway를 차단하려는 많은 연구가 진행되고 있으나 아직 효과는 미미한 실정이다. 패혈증에서 용혈과정이 일어나고 용혈과정을 통해 혈중 혹은 폐조직 내로 나오는 유리/자유 헴이 강력한 산화작용을 통해 NF- κ B pathway를 활성화한다는 연구들 (20, 21)을 유추해 보면, 유리/자유 헴을 제거하는 헤모팩신이 이런 일련의 염증반응을 억제할 수 있을 것으로 기대되고, 헤모팩신 자체가 항염증 기능을 가지고 있다는 연구결과 (30, 31) 또한 패혈증에서의 헤모팩신의 역할을 기대해 볼 수 있겠으나 아직 이에 대한 근거가 부족한 상황으로 패혈증에서 헤모팩신 보충 후 치료 효과에 대한 연구가 필요한 상황이다.

3. 연구 가설

- * 내독소혈증을 마우스에 유발하게 되면 알려진 기전에 의해 마우스에 전신 염증 반응이 나타나고 폐조직 손상이 유발 될 것으로 예상함.
- * 내독소혈증은 용혈 등으로 인하여 발생한 자유/유리 헤모글로빈을 포함한 혈액 부산물 (blood degraded products)을 혈중에 증가시킬 것으로 예상함.
- * 내독소혈증과 혈액 부산물에 의해 NF- κ B pathway를 활성화할 것임.
- * 활성화된 NF- κ B pathway로 염증성 cytokine 분비가 증가할 것임.
- * 활성화된 NF- κ B pathway와 염증성 cytokine에 의해 폐조직이 손상되어 마우스의 사망을 초래할 것임.
- * 헤모팩신은 기존 연구 (30) 에서 밝혀져 있지만 명확한 기전은 알 수 없는 헤모팩신이 가지고 있는 항염증 기능을 통해 전신 및 폐 염증 반응을 줄여 줄 것으로 예상함.
- * 내독소혈증 유발 마우스에 헤모팩신을 투여하면 헤모팩신의 항염증 효과로 인해 생존율이 증가하고 NF- κ B pathway가 억제되며, 폐조직 손상이 감소할 것임
- * 이와 같은 기전을 통하여 헤모팩신은 내독소혈증 후 발생하는 조직 손상과 염증 반응을 억제하며 마우스의 사망률을 감소시킬 것으로 기대됨.

(Figure 3)

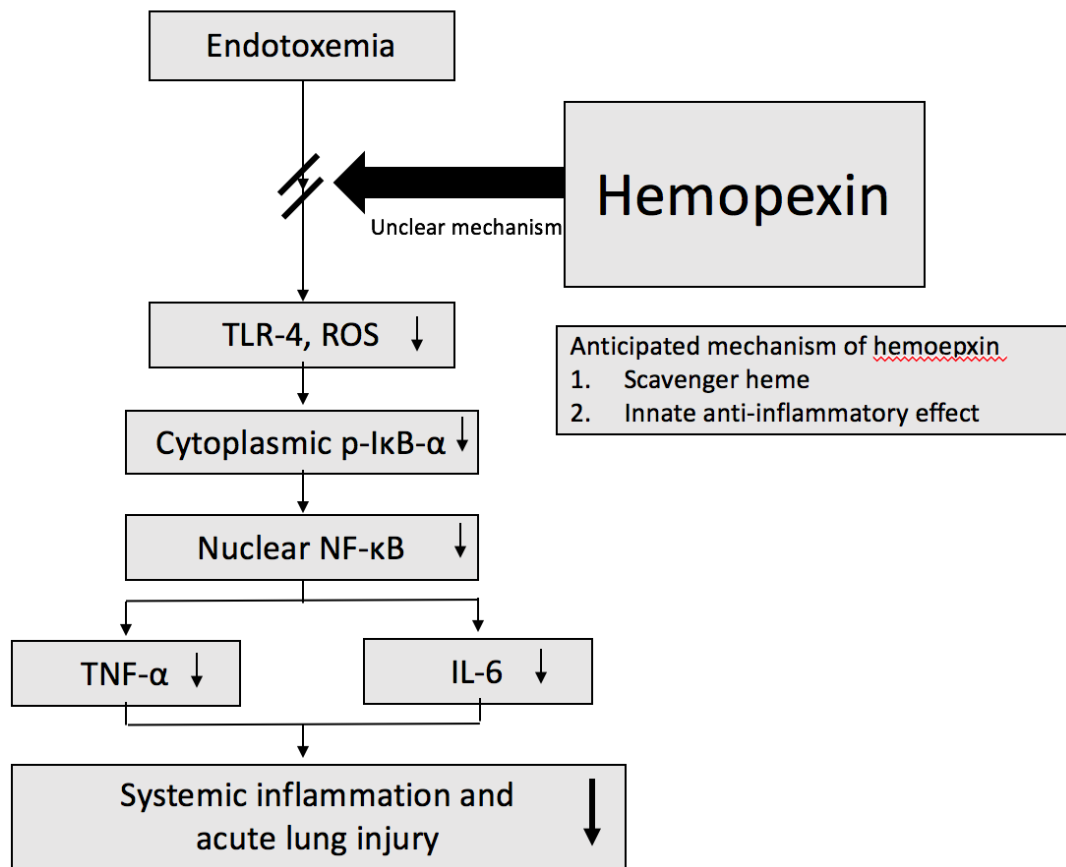


Figure 3. Possible protection mechanism of hemopexin from endotoxemia. Hemopexin supplement causes the attenuation of nuclear factor kappa B pathway, which in turn causes production of inflammatory cytokines and acute lung injury.

4. 연구 목적

내독소혈증(endotoxemia)을 유발한 마우스 모델에서 헤모팩신의 투여가 마우스의 전신 염증 반응을 줄이고 생존율을 높이며, 마우스 폐조직의 염증 반응을 줄이는 것과 헤모팩신의 투여가 내독소혈증 유발 마우스에서 NF- κ B pathway를 억제함을 보여주고 자 한다.

연구 재료 및 방법 (Materials and Methods)

본 연구는 마우스를 이용한 전 임상 연구로 실험과 관련된 모든 과정은 서울대학교병원 의생명연구원의 동물실험 윤리위원회(Institutional Animal Care and Use Committee, No. 15- 0221-S1A0)로부터 승인을 득한 이후에 시행되었다.

1. 연구 재료

1) 실험동물의 획득과 순화 과정

오리엔트 바이오 (Orient Bio, Seongnam-Si, Republic of Korea)에서 구매한 20-23 gram의 수컷 BALB/c 마우스를 이용하여 진행하였다. 본 연구에서는 마우스 성별 간의 호르몬이 미칠 수 있는 영향을 배제하기 위해 수컷 마우스만을 사용하였다. 마우스들은 실험 시작 2주 전에 특수병원균방지 (Specific pathogen free, SPF) 사육실에서 일반적인 마우스 사료와 물을 자유롭게 먹으면서 10시간 동안 밝게, 14시간 동안 어둡게 조명을 반복하여 주위 환경 적응을 시행하였다. 시험 8시간 전부터는 물만 주며 금식을 시행하였다.

2) 실험군 설정

실험에 사용하는 마우스는 3군으로 무작위 배정하여 복강 내에 생리 식염수를 투여하고 이후 꼬리 정맥에 증류수를 투여한 대조군 (control 군) 및 복강 내 LPS를 투여하고 꼬리 정맥에 증류수를 투여한 군 (LPS 군), 복강 내 LPS 투여 후 HPX을 꼬리 정맥으로 투여한 군 (LPS+HPX 군)으로 분류하였다.

3) 실험약 설정

실험에는 Flarebio Biotech LLC (Baltimore, MD)에서 구입한 recombinant mouse 헤모팩신을 구입하여 사용하였으며 구입한 헤모팩신에는 LPS 성분이 포함되어 있지 않음이 확인되었다. 대조군과 LPS 군 및 LPS+HPX 군의 약물 투여 시 동일한 부피의 약물이 들어갈 수 있도록 제조하였다.

2. 연구 방법

1) 실험동물의 마취와 준비

실험에 사용하는 마우스는 체중을 잰 후 tiletamine (30 mg/kg), zolazepam (30 mg/kg), 및 xylazine (10 mg/kg)을 우측 대퇴근육에 근육하여 마취를 유지 하였다.

2) 내독소혈증 유도 및 생존실험

내독소혈증의 유도는 Sigma-Aldrich chemical company (St. Louis, MO) 에서 구입한 대장균의 내독소인 Lipopolysaccharide (LPS from *Escherichia coli* O111:B4)를 사용하였다. 마우스에 내독소혈증을 유발하는 LPS의 양은 이전 연구결과를 참고하였다. (27) 이전 연구 결과, 백서에 LPS 10 mg/kg의 용량을 투여하면 48시간 사망률이 75%의 결과를 보였다. 이 결과를 토대로 실험 대상 마우스에 10 mg/kg의 LPS를 복강 내로 투여하여 내독소혈증을 유발하였다. 마우스에서도 이전 백서 연구와 비슷한 정도의 사망률이 나오는지 보기위해 10마리의 마우스에 10 mg/kg의 LPS를 복강 내로 투여하고 실험의 신뢰성을 확보하기 위해 한 번 더 반복 실험을 진행하였다. 두 번의 실험 결과 마우스에 10 mg/kg의 LPS 투여 이후에 총 75%의 사망률을

보여 향후 실험에도 내독소혈증의 유도는 10 mg/kg의 LPS를 사용하기로 결정 하였다.

3) 내독소혈증 유도 후 헤모팩신 보충 실험

실험은 총 3군으로 진행되었으며 대조군 (control 군)은 정상 마우스의 복강에 생리식염수를 투여하고 30분 후에 꼬리 정맥에 27 gauge 의 바늘 크기를 가지고 있는 주사기를 통해 증류수를 약 1분간 천천히 투여하였다. LPS 군은 대조군과는 꼬리 정맥에 투여하는 방법은 동일하나 복강 내에 LPS를 10 mg/kg 용량으로 투여하였다. LPS+HPX 군은 우선 복강 내에 10 mg/kg의 LPS를 투여하고 이후 30분 후에 위의 증류수와 동일한 양의 부피를 가진 증류수에 희석한 5 mg/kg의 헤모팩신을 1분간 천천히 꼬리 정맥을 통해 투여하였다. 간략한 내용은 아래와 같다.

가. 대조군: 복강 내 생리식염수 투여 + 30분 후 꼬리 정맥 증류수 투여

나. LPS 군: 복강 내 LPS 투여 + 30분 후 꼬리 정맥 증류수 투여

다. LPS+HPX 군: 복강 내 LPS 투여 + 30분 후 꼬리 정맥 HPX 투여

상기에 설정한 3군으로 두 가지 실험을 진행하였다. 첫 번째 실험은 헤모팩

신의 보충이 생존율에 미치는 영향을 보기 위한 생존 실험으로 위의 3군 설정 후에 각 군마다 11마리의 마우스를 통해 0시간, 6시간, 12시간, 24시간, 36시간 시점에서 생존 여부를 관찰하였다. (Figure 4) 두 번째 실험은 헤모팩신의 보충이 전신 염증반응과 폐조직 염증 반응에 미치는 영향을 보기 위하여 시행하였다. 생존 실험의 결과를 토대로 각 군당 5마리의 마우스가 생존할 수 있는 마릿수를 설정 후 실험 시작 0시간, 3시간, 6시간에 희생시켜 헤모팩신의 농도 변화, TNF- α , IL-6, NF- κ B pathway 및 폐조직 등을 분석하였다. (Figure 5)

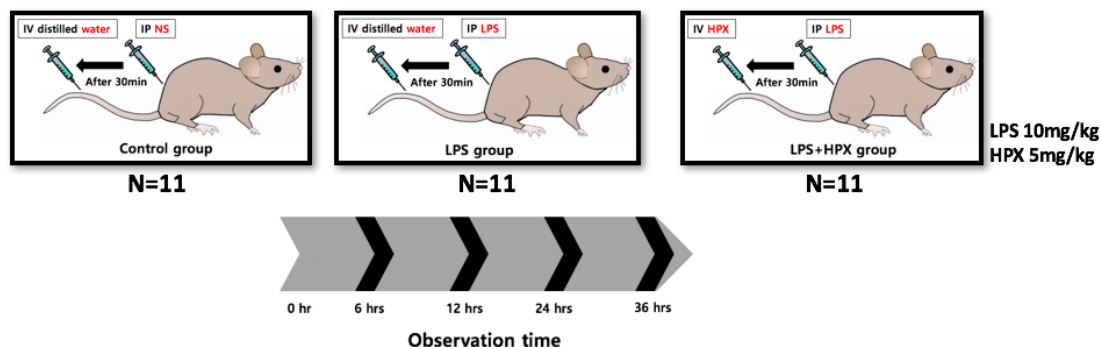


Figure 4. Survival experiments. To compare the mortality of endotoxemic mice administered either hemopexin or a vehicle solution, the mice were divided into "control", "LPS", and "LPS+HPX". First, I intraperitoneally injected mice with either normal saline (control group) or LPS (LPS and LPS+HPX groups), the latter of which was used to stimulate and induce endotoxemia. At 30 min after the injection of normal saline or LPS, I administered distilled water to the control and LPS groups via tail vein; however, the LPS+HPX group received HPX (5 mg/kg) via tail vein. The total volume of injected fluid was the same (5 mL/kg) for all animals. I then closely observed the mice (which were provided with liberal amounts of food and water) for 36 h to evaluate the mortality rates.

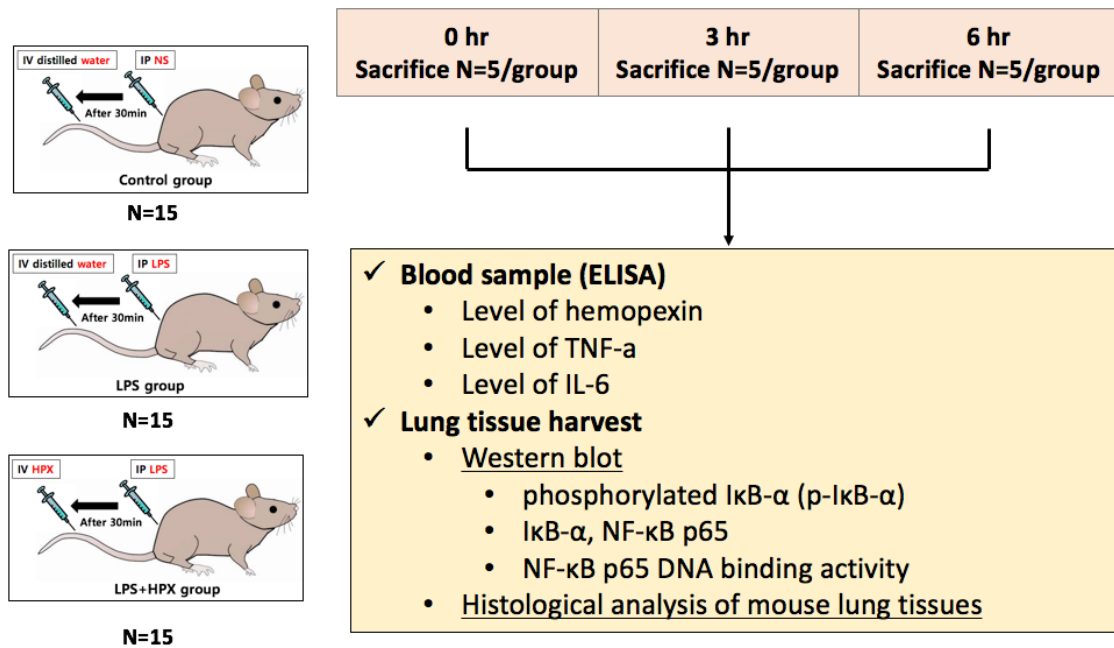


Figure 5. Diagram of experiments to examine the protective effects of hemopexin. Five mice from each group were serially sacrificed at 0, 3, and 6 h after injection with normal saline or LPS to measure the levels of proinflammatory cytokines, hemopexin, and to perform western blot and histologic analysis.

4) 헤모팩신 투여량의 결정

기존 연구를 토대로 헤모팩신의 투여량을 결정하였다. 기존 백서를 이용한 연구에서는 정상군과 내독소혈증을 유발한 군 간에 헤모팩신의 농도 차이가 0.35 mg/mL로 측정되었다. 이는 정상 백서와 내독소혈증을 유발한 백서 간에 25% 정도의 헤모팩신 농도 차이를 보여 주는 결과였다. (27) 알려진 마우스의 혈중 헤모팩신 정상 농도가 0.55–1.25 mg/mL이고 (35) 정상 마우스의 혈액량은 1.5 mL로 알려져 있어서 본 연구에서는 마우스의 정상 헤모팩신 농도를 1.20 mg/mL로 설정하고 헤모팩신 기존 보유량의 5%를 보충적으로 투여한다는 가정에 따라 0.06 mg/mL (=0.09 mg, 5 mg/kg)의 헤모팩신을 보충하는 투여량으로 결정하였다.

3. 결과 지표의 측정

1) 검체 채취

실험 물질 주입 후 0시간, 3시간, 6시간 후에 실험 대상 마우스를 마취시킨 후에 정중 절개를 시행하여 복강 및 흉강을 노출 시킨 후 심장에서 우심실을 천자 하여 혈액을 채취하고 출혈로 인한 사망을 유도하였다. 심장 채혈을 통해 0.5 - 0.7 mL의 전혈을 채혈하고 채혈된 혈액은 즉시 4°C에서 3,000 rpm으로 10분간 원심 분리한 후에 상청 액을 분리하여 영하 70°C 상 태로 보관하였다.

2) Enzyme-linked immunosorbent assays (ELISA)

혈중 TNF- α , IL-6 농도는 DuoSet ELISA kits (R&D Systems, Minneapolis, MN)를 사용해서 측정하였고 혈중 헤모팩신 농도는 Mouse HPX ELISA kit (GenWay, San Diego, CA)를 사용해서 측정하였다. ELISA 후 광학 농도 (optical densities)를 측정하기 위해서 Versa Max microplate reader (Molecular Devices Corp, Sunnyvale, CA)를 사용하였다. TNF- α ,

IL-6 및 헤모팩신의 농도는 제조사에서 제공한 지침에 따른 표준 곡선을 사용하여 계산하였다.

3) 폐조직의 획득

실험 물질 주입 후 0시간, 3시간, 6시간 후에 백서를 마취 시킨 후 심장채혈 직후에 마우스의 폐를 적출하였다. 마우스 좌측 폐는 차가운 생리 식염수로 세척한 이후에 액체 질소를 이용하여 냉동시킨 후 영하 70℃의 냉동고에 보관하여 차후 조직 분석과 western blot analysis에 사용하였다. 우측 폐는 0.1M의 phosphate buffer가 혼합된 4% formaldehyde 용액에 담가 고정한 이후에 paraffin block을 제작하여 Haematoxylin and eosin 염색을 시행하는데 사용하였다.

4) Western blot analysis and NF- κ B binding activity 측정

마우스의 cytoplasmic phosphorylated I κ B- α (p-I κ B- α), I κ B- α 및 NF- κ B p65의 발현 정도를 분석하기 위하여 western blot analysis를 시행하였다. 폐조직을 1%의 protease inhibitor cocktail (Roche, Switzerland)을 포함하는 상용화된 NEPER nuclear and cytoplasmic extraction reagents (Pierce Biotechnology, IL, USA) 1mL에 혼합한 후에 원심분리기를 이용하여 4°C, 12,000 rpm, 20분간 원심분리한 후 핵과 세포질 단백을 추출하였다. 원심분리된 상층 액의 총 단백질 농도는 bicinchoninic acid protein assay kit(Pierce Biotechnology, Rockford, IL)을 사용하여 측정하였다. 단백질 추출물 (45 μ g per lane)을 12% 혹은 15% sodium dodecyl sulphate polyacrylamide gel electrophoresis에 전기 이동을 통하여 분획한 이후에 polyvinylidene difluoride membrane (Schleicher & Schuell, Dassel, Germany)에 전이하였다. 면역반응을 위한 1차 항체 (primary antibodies)로는 I κ B- α , and p-I κ B- α antibodies, NF- κ B p65 antibody (Cell Signaling, Denvers, MA, USA)를 각각 사용하며, 2차 항체 (secondary antibodies)로는 peroxidase와 결합한 immunoglobulin G (IgG) (Amersham International, Buckinghamshire, UK)를 tris buffered saline-Tween

(TBS-T)에 1:5000으로 희석하여 사용하였다. 단백질 검출에는 ECLTM enhanced chemiluminescence system (Amersham International, Buckinghamshire)을 이용하였으며 광 밀도는 computer-assisted densitometric analysis (Lap Work Software, Seoulin Bioscience, Seoul, Korea)를 사용하여 정량화하였다. 모든 검사는 western blot의 loading control로 사용한 β -actin과 histone H1의 농도에 따라 정규화하였다. TransAM method를 사용하여 폐조직의 NF- κ B p65 DNA binding activity를 측정하였으며, NF- κ B p65 transcription factor assay kit (Active Motif, Carlsbad, CA)를 사용하여 폐조직의 NF- κ B transcription factor 활성 정도를 검출하고 정량화하는 데 사용하였다.

5) 병리조직학적 결과의 측정

폐조직을 적출하여 10% paraformaldehyde에 담가 고정 후 paraffin block으로 제작된 폐조직을 이용하여 Haematoxylin and eosin 염색을 시행하였다. 염색이 완료된 폐조직 슬라이드를 통해 폐조직 손상 점수를 확인하였다. 폐조직 손상 점수는 다섯 가지 요소로 구성되어 있다. A. 폐포 내의 호중구 (neutrophil) 수, B. 간질 공간 (interstitial space)의 호중구 수, C. hyaline membrane, D. proteinaceous debris filling airspaces, E. alveolar septal thickening 정도, 의 다섯 가지 요소를 가지고 $([20 \times A] + [14 \times B] + [7 \times C] + [7 \times D] + [2 \times E]) / (\text{number of fields } 100)$ 의 계산식을 통해 계산하였고 점수의 범위는 0부터 1점 사이를 가지게 된다. (35) (Table 1) 모든 슬라이드는 고배율 현미경을 이용하여 연구의 목적을 알지 못하는 병리학자에 의해 최소 30부위 이상을 관찰하여 점수를 계산하였다.

Table 1. Lung injury scoring system

parameter	Score per field		
	0	1	2
A. neutrophil in the alveolar space	none	1–5	>5
B. Neutrophil in the interstitial space	none	1–5	>5
C. Hyaline membranes	none	1	>1
D. Proteinaceous debris filling the air spaces	none	1	>1
E. Alveolar septal thickening	<2x	2x–4x	>4x

4. 결과의 분석

연속변수는 정규분포를 따르는 경우는 평균 (mean)과 표준 편차 (standard deviation)로 요약 통계를 표시하며 정규분포를 따르지 않는 경우에는 중간 값 (median)과 사분위 값의 범위 (interquartile range, IQR)으로 나타내었다. 생존율을 분석하기 위하여 Kaplan-Meier 생존 분석과 log-rank Hochberg post hoc 검사를 사용하였다. 헤모팩신 및 염증 cytokine의 시간 대별 변화를 측정하기 위해 one-way repeated measured analysis of variance (ANOVA) 검사를 사용하였다. p 값이 0.05 미만인 경우에 통계적으로 의미 있는 차이로 판단하였으며 이외의 자료는 모두 Mann-Whitney U post hoc test with bonferroni correction을 사용하여 분석하였고 bonferroni correction을 한 경우에는 p 값이 0.017 미만인 경우에 통계적으로 유의한 차이가 있다고 판단하였다. 통계 분석에는 Stata 14.0 (Stata Corp, College Station, TX) 을 사용하였다.

연구 결과 (Results)

1. 생존율 결과

앞서 설정한 대조군, LPS 군, LPS+HPX 군의 세군에서 각 11마리의 마우스를 가지고 생존실험을 한 결과 대조군에서는 총 11마리 중 11마리가 모두 생존하였다. LPS 군에서는 총 11마리 중에서 12시간 이내에 1마리가 사망하였고 12시간에서 24시간 사이에 추가로 6마리가 사망하였으며 이후 더 이상의 사망은 없어, 총 11마리 중 36시간 이내에 총 7마리가 사망하여 63.6%의 사망률을 보였다. LPS+HPX 군에서는 총 11마리 중에서 24시간 이내에만 1마리가 사망하여 36시간 사망률은 9.1%를 보였다. (Figure 6)

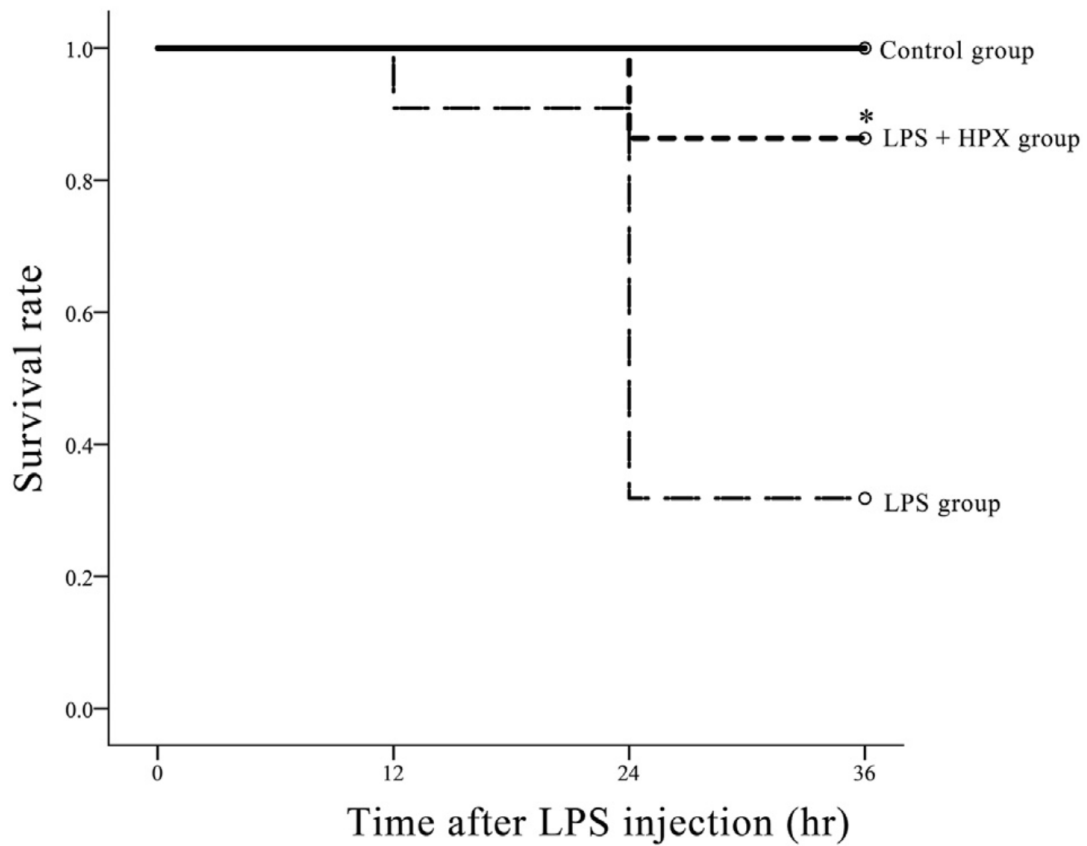


Figure 6. Kaplan–Meier survival curves. Survival was monitored for 36 hours after LPS injection. The Kaplan–Meier survival curve shows that hemopexin reduces the mortality caused by endotoxemia. * $p < 0.01$ versus animals treated with LPS alone. Control, intraperitoneal administration of normal saline; LPS group, intraperitoneal administration of LPS (10 mg/kg); LPS + HPX group, intraperitoneal administration of LPS (10 mg/kg) plus intravenous administration of hemopexin (5 mg/kg)

2. 혈중 헤모펙신 및 염증 cytokine 농도 측정 결과

1) Serum hemopexin level

대조군에서의 0시간의 혈중 헤모펙신의 농도의 중간 값은 1,390.4 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 IQR은 1,212.0–1,507.9 $\mu\text{g/mL}$ 이었다. 대조군에서의 3시간에서의 혈중 헤모펙신의 농도는 중간 값이 1,365.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 1,140.0–1,383.2 $\mu\text{g/mL}$) 이었다. 대조군에서 6시간에서의 혈중 헤모펙신의 농도의 중간 값은 1,367.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 1,196.5–1,411.2 $\mu\text{g/mL}$) 이었다. 대조군에서 헤모펙신의 시간에 따른 변화는 차이가 없는 것으로 확인되었다. ($p = 0.783$)

LPS 군에서 혈중 헤모펙신의 농도는 중간 값으로 0시간, 1,432.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 1,270.5–1549.5 $\mu\text{g/mL}$), 3시간 1,356.7 $\mu\text{g/mL}$ (1,346.2–1,602.3 $\mu\text{g/mL}$), 6시간 1,658.7 $\mu\text{g/mL}$ (1,503.8–1,736.4 $\mu\text{g/mL}$)이었고, 역시 시간의 변화에 따른 혈중 헤모펙신의 농도의 변화에는 차이가 없는 것으로 확인되었다. ($p = 0.091$)

LPS+HPX 군의 혈중 헤모펙신의 농도는 중간 값으로 0시간 1,345.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 1,290.0–1,450.5 $\mu\text{g/mL}$), 3시간 1,394.5 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 1,366.7–1,459.8 $\mu\text{g/mL}$), 6시간 1813.6 $\mu\text{g/mL}$ (1,799.9–1,907.2 $\mu\text{g/mL}$)이었다. LPS+HPX 군의 시간에 따른 헤모펙신의 농도는 시간이 지남에 따라 유의하게 증가하는 것으로 나타났다. ($p <$

0.001) 특히 6시간에서의 LPS+HPX 군의 헤모펙신 농도는 대조군과 LPS 군에 비해서 유의하게 높았다. [vs 대조군 ($p < 0.01$), vs LPS 군 ($p < 0.017$)] (Figure 7)

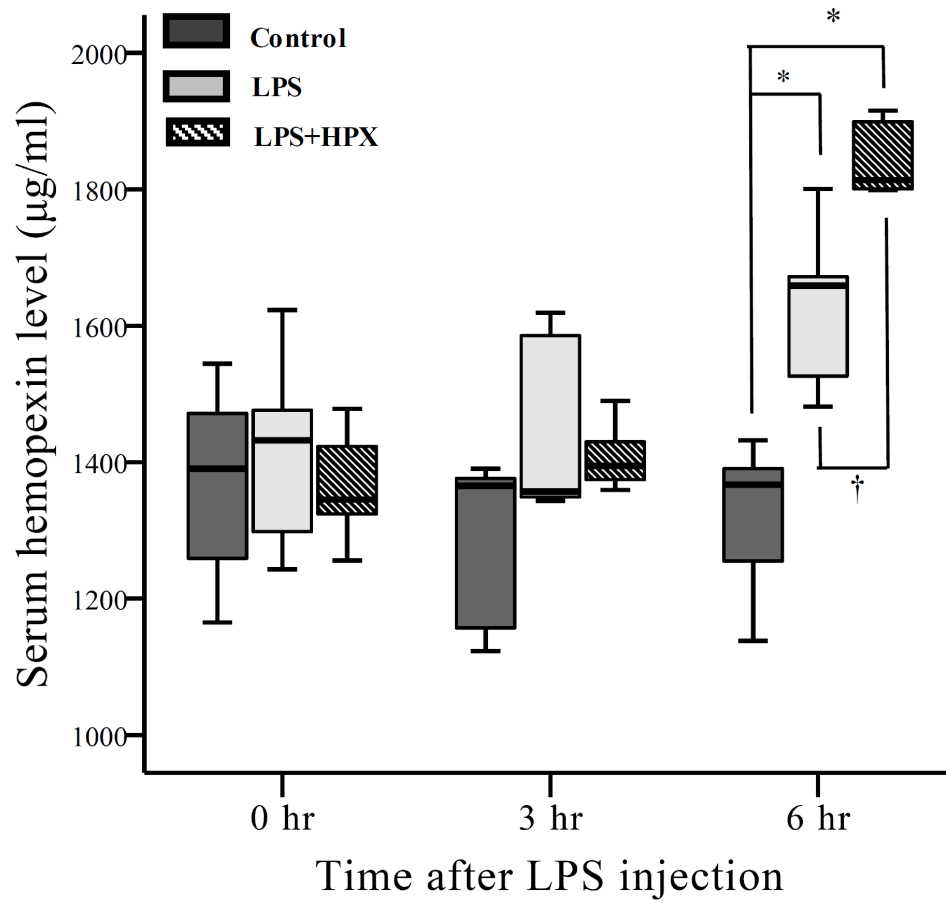


Figure 7. Serum levels of hemopexin. The serum HPX levels were higher in the LPS+HPX-treated animals than those in the control and LPS-treated animals. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.01$, † $p < 0.017$.

2) Tumor necrosis factor alpha level (TNF- α)

대조군에서의 0시간에서의 혈중 TNF- α 의 농도의 중간 값은 3.0 $\mu\text{g/mL}$ 이었고 IQR은 0.0-12.5 $\mu\text{g/mL}$ 이었고, 3시간에서는 6.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 0.0-40.5 $\mu\text{g/mL}$) 이었으며, 6시간에는 2.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 0.0-24.5 $\mu\text{g/mL}$) 이었다. 대조군에서 혈중 TNF- α 의 시간에 따른 변화는 차이가 없는 것으로 확인 되었다. ($p = 0.931$) LPS 군에서 혈중 TNF- α 의 농도는 중간 값으로 0시간에서 4.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 0.0-16.5 $\mu\text{g/mL}$), 3시간 911.1 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 829.6-978.7 $\mu\text{g/mL}$), 6시간 324.1 $\mu\text{g/mL}$ (259.7-393.6 $\mu\text{g/mL}$) 이었고 시간의 변화에 따른 혈중 TNF- α 의 농도는 유의한 차이를 보였다. ($p < 0.001$) LPS+HPX 군의 혈중 TNF- α 의 농도는 중간 값으로 0시간에서 0.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 0.0-8.0 $\mu\text{g/mL}$), 3시간 478.0 $\mu\text{g/mL}$ (IQR, 413.5-622.1 $\mu\text{g/mL}$), 6시간 200.9 $\mu\text{g/mL}$ (175.0-229.7 $\mu\text{g/mL}$) 이었다. LPS+HPX 군의 시간에 따른 TNF- α 의 농도는 시간이 지남에 따라 유의하게 변화하는 것으로 나타났다. ($p < 0.001$) 3시간 및 6시간에서의 LPS+HPX 군의 TNF- α 농도는 LPS 군에 비해서 유의하게 낮았다. [vs 3시간 ($p < 0.017$), vs 6시간 ($p < 0.01$)] (Figure 8)

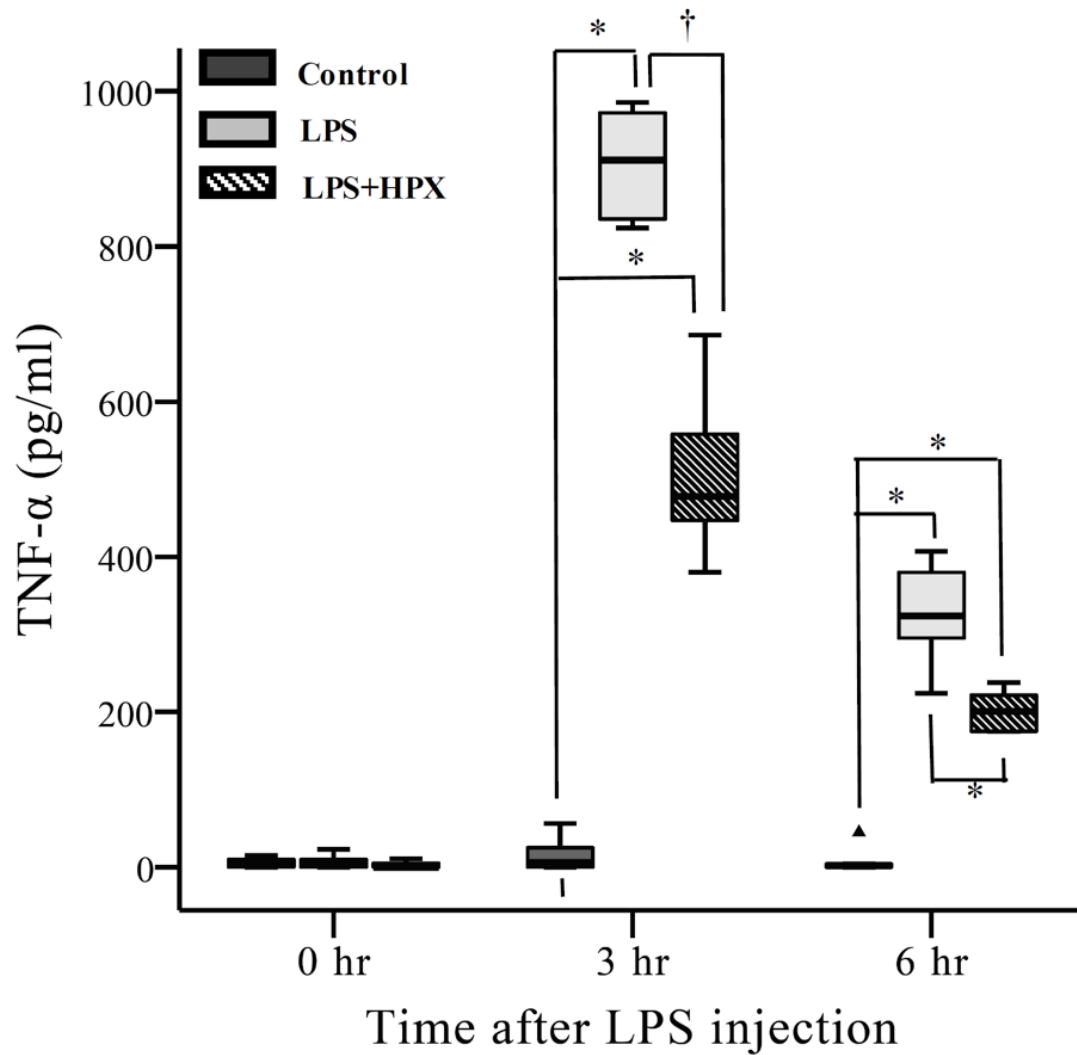


Figure 8. Serum levels of tumor necrosis factor alpha. At 3 and 6 h, treatment with hemopexin resulted in lower serum TNF- α levels than those observed in the animals treated with LPS alone. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.01$, † $p < 0.017$.

3) Interleukin-6 level (IL-6)

대조군에서의 0시간에서의 혈중 IL-6의 농도의 중간 값은 17.0 pg/mL 이었고 IQR은 0.0-35.0 pg/mL 이었고, 3시간에서는 0.0 pg/mL (IQR, 0.0-33.0 pg/mL) 이었으며 6시간에서는 9.0 pg/mL (IQR, 0.0-16.5 pg/mL) 이었다. 대조군에서 혈중 IL-6의 시간에 따른 변화는 차이가 없는 것으로 확인 되었다. ($p = 0.887$) LPS 군에서 혈중 IL-6의 농도는 중간 값으로 0시간에서 3.0 pg/mL (IQR, 0.0-16.5 μ g/mL), 3시간 1704.5 pg/mL(IQR, 1666.8-1751.2 μ g/mL), 6시간 1618.7 pg/mL (1572.3-1652.5 pg/mL)이었고 시간의 변화에 따른 혈중 IL-6의 농도는 유의한 차이를 보였다. ($p < 0.001$) LPS+HPX 군의 혈중 IL-6의 농도는 중간 값으로 0시간에서 3.0 pg/mL (IQR, 0.0-8.0 pg/mL), 3시간 1686.8.0 pg/mL (IQR, 1673.1-1720.9 pg/mL), 6시간 1474.7 pg/mL (1385.1-1532.5 pg/mL) 이었다. LPS+HPX 군의 시간에 따른 IL-6의 농도는 시간이 지남에 따라 유의하게 변화하는 것으로 나타났다. ($p < 0.001$) 3시간 및 6시간에서의 LPS+HPX 군의 IL-6 농도는 LPS군에 비해서 유의하게 낮았다. ($p < 0.01$) (Figure 9)

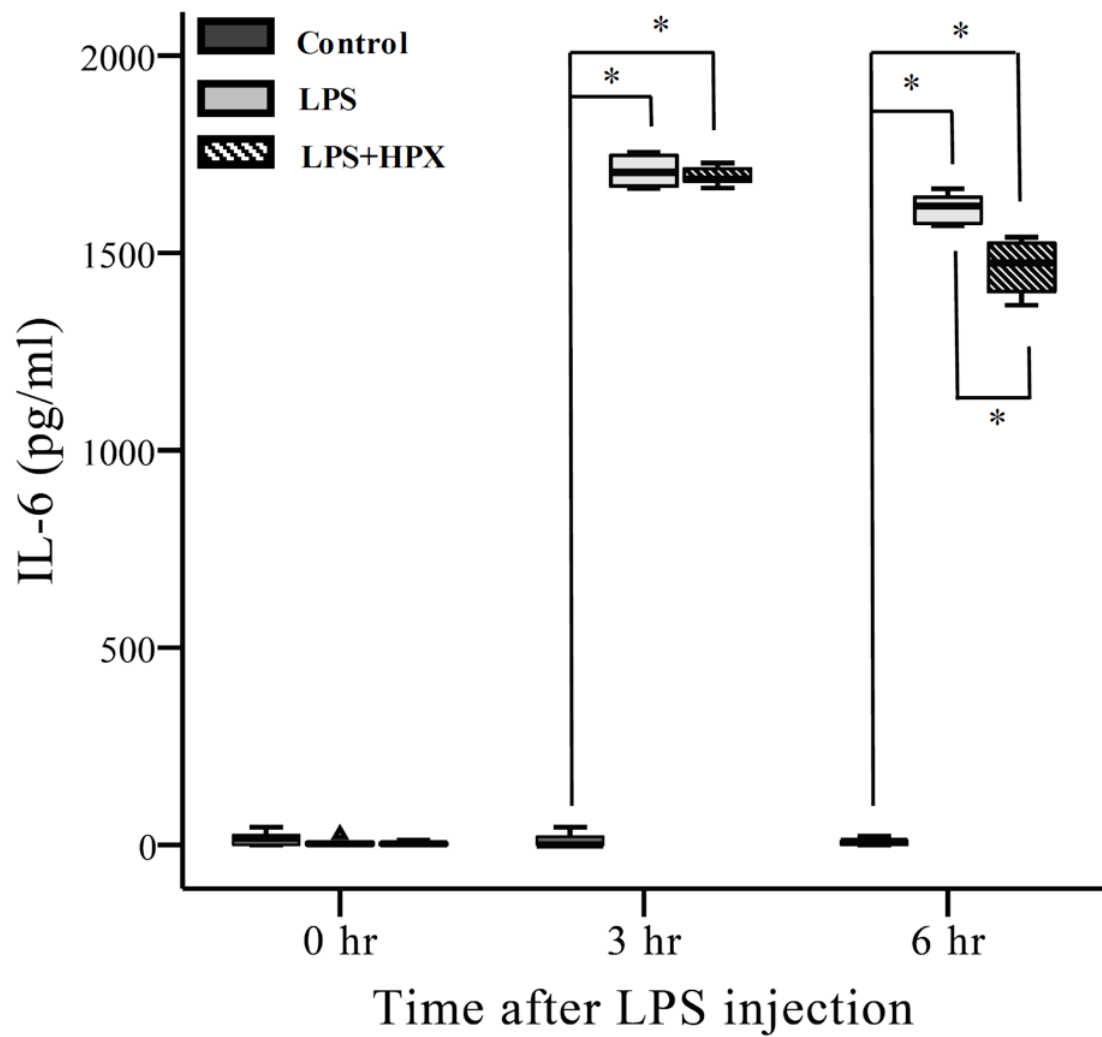


Figure 9. Serum levels of interleukin-6. At 6 h the IL-6 levels were lower in the LPS D HPX-treated animals than in the LPS-treated animals. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.01$, † $p < 0.017$.

4. Tissue assay and Western blot results

1) Western blot 결과

마우스의 폐조직을 이용하여 cytoplasmic p-I κ B- α , I κ B- α ,와 NF- κ B p65 발현을 측정하였다. 대조군과 비교하였을 때, LPS 군과 LPS+HPX 군의 p-I κ B- α 와 NF- κ B p65의 발현은 통계적으로 유의하게 높았다. (p = 0.002, 모두) 반대로 I κ B- α 의 발현은 대조군과 비교하였을 때 LPS 군에서만 유의하게 낮았다. (p =0.002) LPS+HPX 군의 cytoplasmic p-I κ B- α , NF- κ B p65 발현은 LPS 군보다 유의하게 증가하여 있었지만 (p < 0.017), I κ B- α 는 유의한 차이를 보이지 않았다. (p = 0.065) (Figure 10-12)

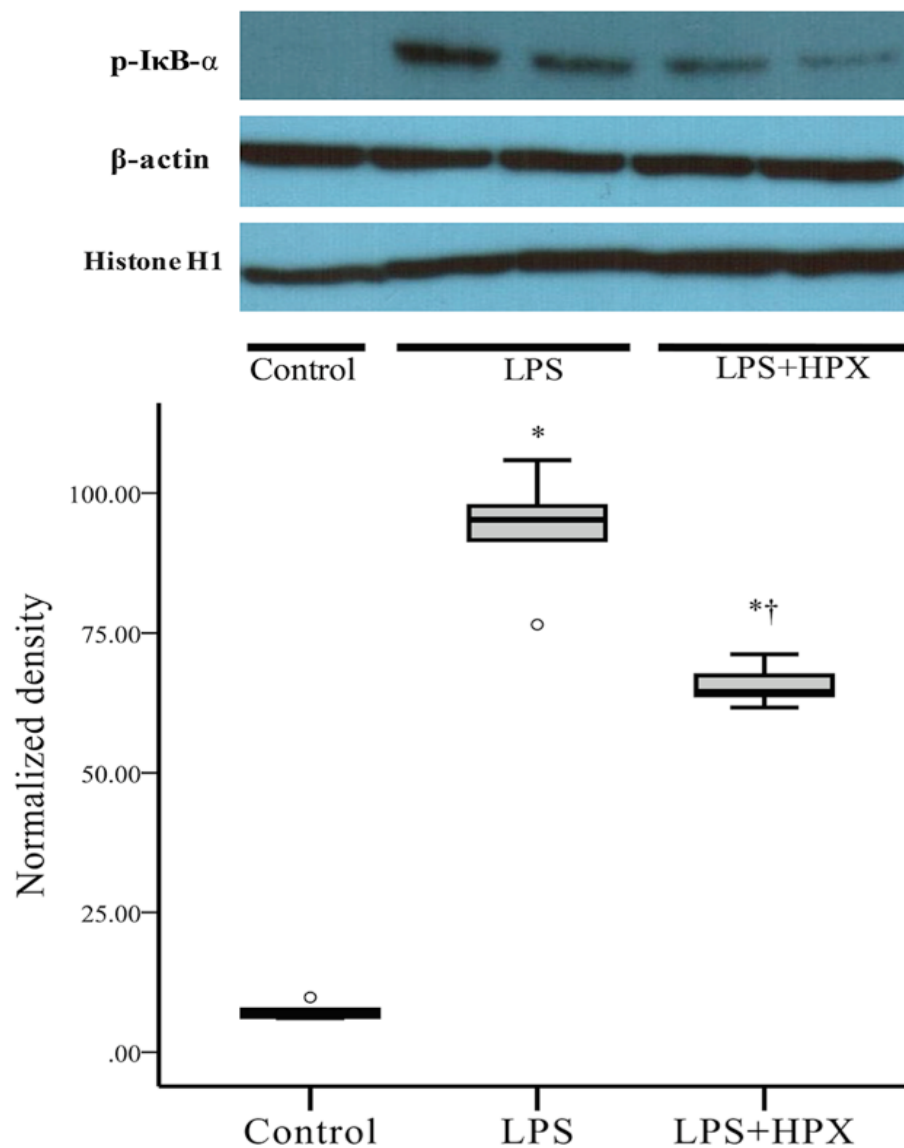


Figure 10. Cytoplasmic expression levels of phosphorylated IκB-α. The blots are representative of the results for five mice per group. The expression levels of p-IκB-α in the LPS+HPX group was lower than that of LPS group. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.005$ versus the control group, † $p < 0.017$ versus the LPS group.

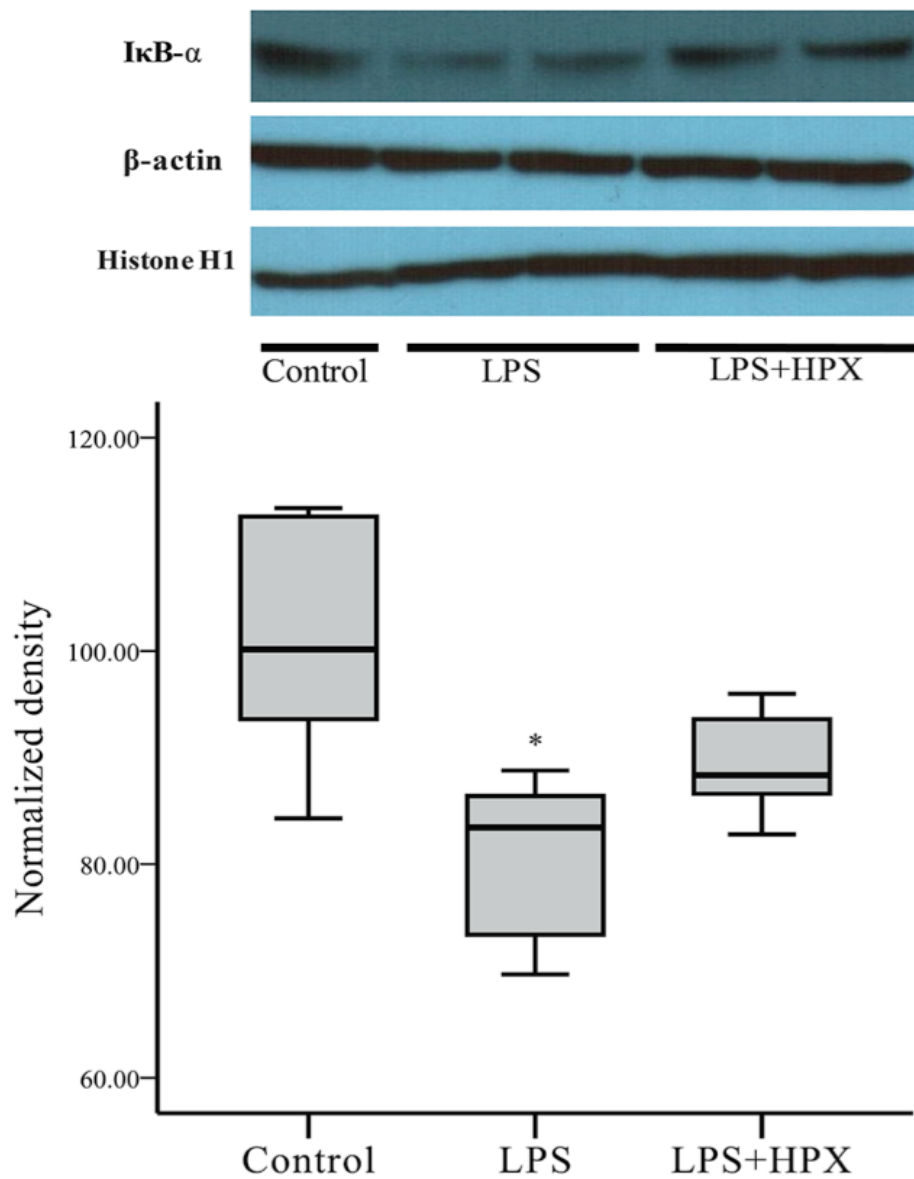


Figure 11. Cytoplasmic expression levels of IκB-α. The blots are representative of the results for five mice per group. The expression levels of IκB-α in the LPS group was lower than that of control group. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.005$ versus the control group.

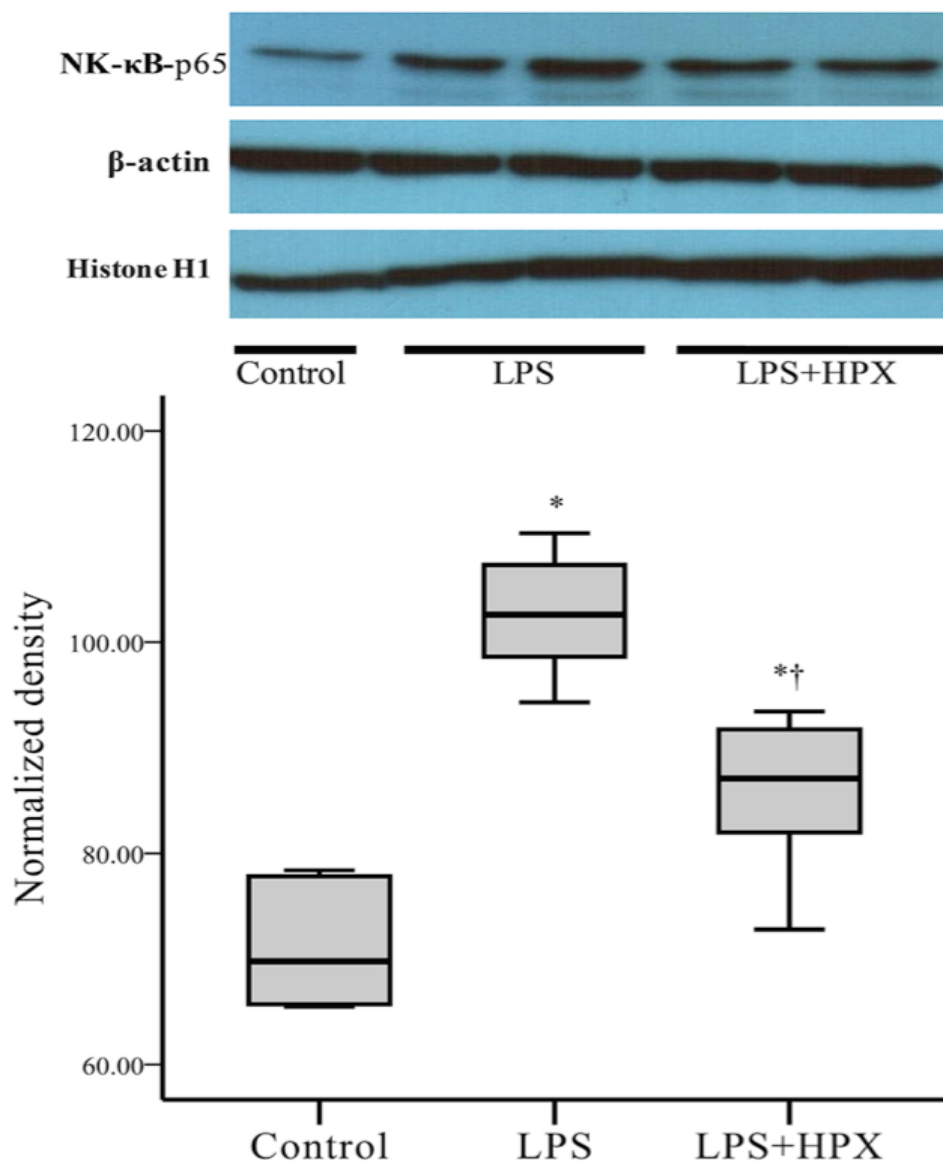


Figure 12. Cytoplasmic expression levels of NF-κB p65. The blots are representative of the results for five mice per group. The expression levels of NF-κB p65 in the LPS+HPX group was lower than that of LPS group. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.005$ versus the control group, † $p < 0.017$ versus the LPS group.

2) Nuclear factor kappa-B transcription factor assays 결과

마우스의 폐조직을 이용하여 NF- κ B p65 binding activity와 cytoplasmic p-I κ B- α to I κ B- α ratio를 측정하였다. LPS 투여 6시간 후에 NF- κ B p65 binding activity는 LPS+HPX 군에서 대조군보다 유의하게 높았으며 ($p = 0.002$), LPS 군에 비해 유의하게 낮았다. ($p = 0.002$) (Figure 13)

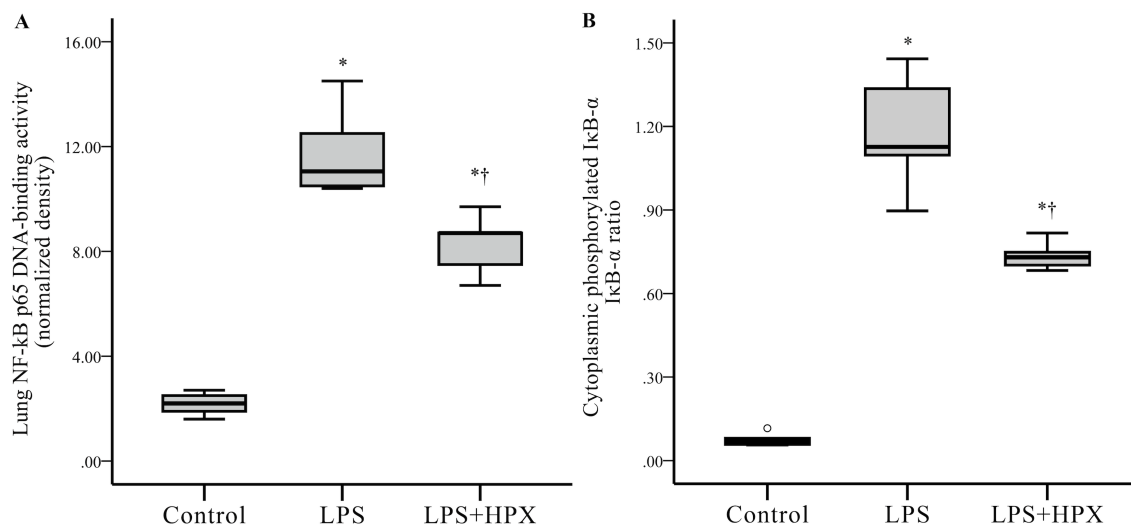


Figure 13. (A) The DNA binding activity of NF- κ B in lung tissues at 6 h after LPS treatment and (B) the ratio between the cytoplasmic p-I κ B- α and I κ B- α levels in lung tissue. HPX downregulates NF- κ B pathway activity in lung tissues. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.005$ versus the control group. † $p < 0.005$ versus the LPS group.

5. 병리 조직학적 결과

1) Haematoxylin and eosin stain

폐조직에서 Haematoxylin and eosin stain 한 슬라이드를 확인한 결과 LPS+HPX 군에서는 LPS 군에 비해 폐조직 손상 정도가 작게 나타나는 모습을 보였다. (Figure 14)

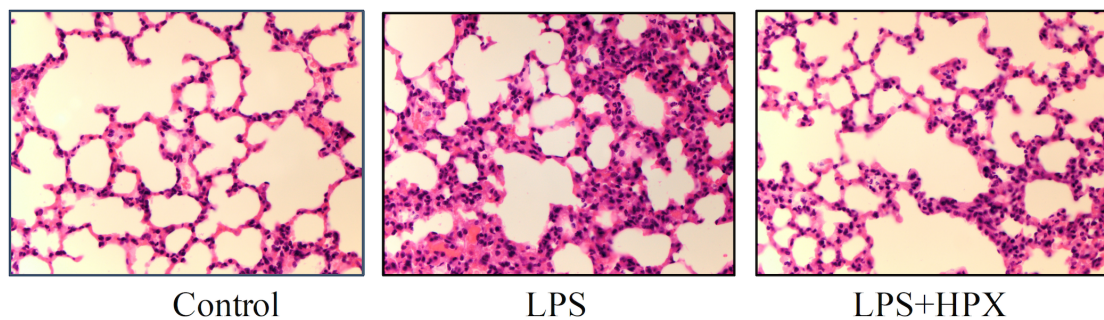


Figure 14. Histologic evaluations of lung tissues. Microphotographs showing lung tissues (Haematoxylin and eosin stained tissues, 400x).

The data show that hemopexin reduces the histologic injuries.

2) Lung injury score

폐조직에서 Haematoxylin and eosin stain 한 슬라이드에서 폐조직의 손상 정도를 점수화한 결과 중간 값으로 대조군은 0.28점 (IQR, 0.28–0.32점), LPS 군은 0.90점 (IQR, 0.86–0.97점), LPS+HPX 군은 0.80점 (IQR, 0.64–0.87점)이었다. LPS+HPX 군이 LPS 군에 비해 통계학적으로 유의하게 낮은 폐 손상 점수를 기록하였다. ($p < 0.016$) (Figure 15)

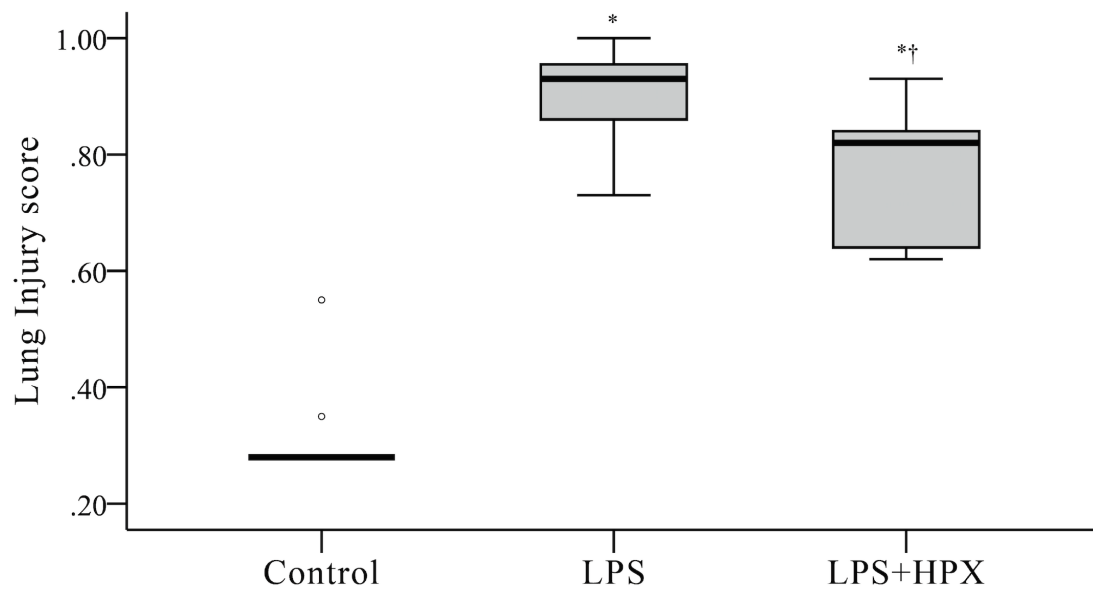


Figure 15. Injury scores of lung tissues. lung injury scores in each group (control, LPS, and LPS D HPX). The data show that hemopexin reduces the lung injury scores. The data are presented as the median (quartiles, range). * $p < 0.005$ versus the control group. † $p < 0.017$ versus the LPS group.

고 찰

헤모펙신 (hemopexin)은 우리 몸의 혈장에서 4번째로 많은 혈장 단백질로 주 역할은 우리 몸에서 free 헤스를 제거하는 scavenger protein의 역할을 하며 동시에 체 내의 철 대사에 관여하고 있고, 일반적으로 만성 용혈 상태나 신경 근육병에서 상승해 있다. (37)

최근 연구에 의하면 중증 패혈증에서 세균이 혈관 내 용혈을 일으켜 혈중 헤모글로빈의 농도를 증가시키며, 혈중 헤모글로빈은 즉시 분해되어 헤스와 글로빈으로 분리되며, 분리된 헤스는 신체 내에 작용하여 염증반응을 악화시킨다고 알려져 있다. (38-40) 또한 유리/자유 헤스는 강력한 산화작용을 하여 단백질, 지방, 탄수화물 및 핵산의 변형을 유발하여 다양한 조직 손상을 일으킨다고 알려져 있다. LPS를 사용하여 내독소혈증을 유발한 마우스 연구에서 내독소혈증을 유발한 마우스의 혈중 헤스의 농도가 증가해있고, 증가한 헤스의 산화반응으로 인하여 대식세포에서 cytokine의 분비가 증가한다는 연구 결과가 이를 뒷받침해 준다. (41)

패혈증 상태에서 용혈 반응이 일어나면, 결과적으로 혈중 유리/자유 헤스의 농도가 증가하게 되고, 유리/자유 헤스의 농도 증가는 염증 반응의 가속화와 조직의 손상을 유발한다고 할 수 있으며, 이러한 반응을 헤스를 포함하는 단백질인 헤모펙신이 줄여줄 수 있을 것으로 판단된다. 최근 연구 결과에 따르면

내독소혈증의 중증도에 따라 백서의 혈중 헤모팩신 농도가 달라진다는 결과가 있었으며, 이 연구에서는 중증 내독소혈증을 유발한 군이 경증 내독소혈증을 유발한 군에 비해 혈중 헤모팩신 농도가 유의하게 감소해 있었음과 실제 패혈증 환자에서 사망한 군이 생존한 군에 비해 초기 헤모팩신의 농도가 낮았음을 보고하였다. 이 연구의 결과는 헤모팩신이 유리/자유 험을 제거하는 것이 포합 방식으로 작용한다는 것을 시사하고 있다. 즉 헤모팩신의 혈중 농도는 비교적 일정하고 일정량의 험을 제거할 수는 있으나 체 내의 헤모팩신으로 제거할 수 없는 양의 험이 방출 시에는 고갈되어 역할을 하지 못하고 염증 반응 및 조직 손상이 진행됨을 시사하고 있다. (27) 또한 다른 *in vitro* 연구들 (30, 31)에서는 대식세포에 LPS를 처리하고 염증성 cytokine의 분비에 대한 연구를 진행했는데 이 연구에서는 대식세포에 LPS를 처리한 후 혈액 부산물인 험을 추가 처리하면 염증반응이 더욱 가속화됨을 보여 주었다. 여기에 헤모팩신을 LPS만 처리가 된 군과 LPS에 혈액 부산물인 험을 처리한 군에 각각 투여했더니 LPS에 혈액 부산물인 험을 처리한 군뿐만 아니라 LPS만 처리한 군에서도 항염증 효과가 나타나는 결과를 보여 주고 있어서 헤모팩신은 항염증 작용은 유리/자유 험을 제거하는 역할 외에도 본연의 항염증 작용이 있을 것으로 생각이 된다. 하지만 본 연구를 비롯하여 다른 연구에서도 헤모팩신이 세포 수준에서 어떤 방식으로 어떤 부위에 작용

하는지에 대해서는 밝혀진 바가 없어 현재까지는 명확한 기전을 설명하기 어려운 상황이다.

본 연구에서는 중증 내독소혈증을 유발한 마우스에서 헤모팩신을 보충하는 것이 생존율을 증가시키고 각종 염증성 cytokine을 줄이며 폐조직의 손상을 줄여주는 것을 보여주었다. 또한 중증 내독소혈증을 유발한 마우스에서 헤모팩신의 보충이 cytoplasmic I κ B의 인산화를 줄여주고 폐조직에서 NF- κ B의 DNA binding activity를 줄여주는 것을 보여주었다. 이러한 결과는 헤모팩신의 보충이 내독소혈증을 유발한 마우스에서 NF- κ B pathway를 억제하여 전신 염증 반응과 폐조직의 염증 반응을 줄여 준다는 것을 시사하고 있다.

브로민 (bromine) 가스로 급성 폐 손상을 유발한 동물 모델에서 자유/유리헴이 폐조직의 염증 반응을 가속화하고 사망률을 증가시킨다는 보고가 있었다. 이 모델에 헤모팩신을 투여하면 폐의 염증 반응이 줄어들고 사망률을 감소시키는 결과를 보여 헤모팩신이 폐 손상을 줄여주고 생존율을 높여주는 치료적인 물질로서의 가능성을 보여주었다. (31) 또 다른 여러 연구에서도 헤모팩신이 내독소혈증을 포함한 각종 용혈 상태와 sickle cell anemia 및 패혈증의 예후를 결정하는 중요한 요소임이 알려져 있다. (27, 30, 31, 42) 또 다른 in vitro 연구에서도 헤모팩신이 LPS로 처리한 대식세포에서

dose-dependent 방식으로 염증성 cytokine을 줄여 주었다. (43) 본 연구에서도 유사하게 헤모팩신의 보충이 염증성 cytokine인 TNF- α 와 IL-6의 농도를 감소시켰고 생존율을 증가시켰다.

패혈증이나 내독소혈증에서의 급성 폐 손상의 기전은 NF- κ B pathway의 활성화와 아주 밀접한 관련이 있다고 알려져 있으며, NF- κ B pathway를 억제하거나 약화시키면 폐 손상의 정도가 약해진다는 연구 결과들이 있다. (20, 21) 본 연구에서도 내독소혈증을 유발한 마우스에서 헤모팩신의 보충으로 I κ B- α 의 인산화를 억제하였고 결과적으로 폐조직에서 NF- κ B p65를 줄여 NF- κ B pathway를 억제함을 보여주고 있다. 이와 더불어 본 연구에서는 헤모팩신의 보충이 급성 폐 손상 점수를 유의하게 감소시키며 조직학적으로 폐 염증을 줄여준다는 것을 보여 주고 있다. 이런 결과는 헴에 의한 급성 폐 손상을 헤모팩신이 줄여 줄 수 있다는 다른 연구 결과들 (32-34)과 일치하는 결과를 보여 주고 있어 향후 헤모팩신이 내독소혈증으로 유발된 폐 손상의 치료제로서의 가능성을 시사 한다고 할 수 있겠다.

기존 내독소혈증을 유발한 백서의 연구에서는 (27) 내독소혈증을 유발한 후 시간의 변화에 따라 LPS 군의 혈중 헤모팩신의 농도가 대조군에 비해 유의하게 낮은 결과를 보였지만 마우스를 사용한 본 연구에서는 시간의 변화에 따른 LPS 군의 헤모팩신의 농도가 대조군에 비해 유의하게 낮아지지 않

왔다. 이는 백서와 마우스의 LPS에 대한 감수성에서 종에 따른 차이 (species-specific difference)가 있을 가능성이 있다. 다른 가설은 body surface normalization method를 사용해 보면 본 연구에서 마우스에 사용한 LPS 10 mg/kg의 용량이 백서에서는 5 mg/kg 의 용량과 동등한 용량일 것으로 판단이 되어 기존 연구에 비해 내독소혈증의 정도가 약했을 가능성이 있다. 또한 본 연구에서 LPS 군에서 상대적으로 대조군에 비해 6시간째 헤모팩신의 농도가 높은 것은 헤모팩신의 acute phase reactants로서의 역할과도 관련이 있을 것으로 생각되며 (44) 향후 연구에서는 다양한 양 (dose)의 LPS의 투여가 필요하겠다.

본 연구에서는 헤모팩신의 보충이 전신 및 폐의 염증 반응을 줄이고 생존율의 향상을 보기 위해 LPS로 내독소혈증을 유발한 후 30분 후에 헤모팩신을 투여하였다. 일반적으로 내독소혈증의 염증 효과는 내독소 투여 후 초기에 주요 반응 들이 나타나므로 본 연구에서도 초기 염증반응을 억제하기 위해 30분이라는 시간 간격을 설정하였고 결과적으로 초기 헤모팩신의 투여가 효과적임을 보여주었다.

Figure 10에서 보듯이 western blot 결과에서 house keeping 단백질인 histone H1이 LPS+HPX 군에서 통계학적으로는 차이가 없으나 다른 군에 비해 육안으로 높아 보이는 경향을 보이고 있다. 비록 통계학적으로 의미 있

게 histone H1의 농도가 다른 군에 비해 LPS+HPX 군에서 높다고 하더라도 이 군에서 NF- κ B 활성이 감소해 있기 때문에 최종 결과에는 영향을 미치지 않았을 것으로 생각된다.

본 연구는 여러 가지 제한 점이 있다. 첫 번째로 헤모팩신 보충의 효과를 보기 위해 LPS를 통한 내독소혈증을 유발한 인공호흡기를 적용하지 않은 마우스 모델을 사용하였다. 비록 내독소혈증 모델이 패혈증과 유사하여 여러 패혈증 관련 연구에서 이용되고 있으나 실제 패혈증을 가진 사람에서의 임상 양상을 완전히 반영하지는 못하고 있어 (45, 46) 아직까지 연구 결과를 사람에게 적용하기는 힘들며, 향후 실제 패혈증 모델에서 입증이 필요하겠다.

두 번째는 내독소혈증을 유발한 후 30분 후에 헤모팩신을 보충하는 하는 것이 실제 임상 상황에서 사람에게 어떤 효과를 미치는지는 미지수이다. 비록 내독소혈증에서는 헤모팩신의 30분 후 투여가 효과를 보이고 있으나 실제 임상 상황에서는 어떤 효과를 보이는지에 대한 추가적인 연구가 필요하겠다. 또한 보충하는 헤모팩신의 용량 또한 연구자가 기존 연구를 추정하여 계산한 것으로 향후 적절한 용량을 찾는 연구 또한 필요하겠다.

세 번째로는 본 연구에서는 유리 헤ムの 농도를 측정하지 못하였다. 비록 기존 연구들에서 내독소혈증 유발 후 유리 헤ם이 증가한다는 결과를 일관적으

로 보여주고 있으나 본 연구에서는 측정하지 못하였고 향후 연구에서는 반드시 측정할 필요성이 있겠다.

네 번째, 본 연구에서는 헤모팩신을 투여하지 않는 군에서는 혈관 내로 증류수를 투여하였다. 비록 투여량은 적지만 증류수 투여 역시 용혈을 일으킬 수 있다고 알려져 있다. 헤모팩신 또한 증류수를 통해 용해하여 투여하였으므로 결과에는 큰 차이가 없을 것으로 추정되나 향후에는 용혈을 최소화한다고 알려져 있는 dextrose 용액을 투여해야 할 것으로 고려된다.

다섯 번째로는 본 연구에서는 내독소혈증을 유발한 군에서만 헤모팩신을 투여하여 대조군, LPS 군, LPS+HPX 군 세군을 비교하였다. 하지만 헤모팩신 자체에 대한 조직의 반응 및 염증성 물질의 반응 여부도 확인이 필요할 것으로 판단되며 이를 위해서는 향후 대조군+HPX 에 대한 검증이 필요할 것으로 생각된다. 여섯 번째, 본 연구에서는 NF- κ B pathway의 활성화 정도를 폐조직의 western blot 결과로 제시하였다. 일반적으로 실험의 신뢰도를 확보하기 위해서는 동일 검체 (이번 연구에서는 폐조직)로 polymerase chain reaction (PCR) 등을 한 번 더 시행하여 검사의 신뢰성을 높이는 것이 필요하였으나 마우스라는 소형 실험동물의 한계로 인해서 검사에 필요한 충분한 조직을 얻지 못하여 시행하지 못하였다. 향후 연구에는 검체 채취가 비교적 용이한 실험동물의 선택과 추가 실험이 필요하겠다.

마지막으로 본 연구에서는 pro-inflammatory cytokine인 IL-6와 TNF- α 의 농도가 6시간까지만 제시되어 있다. 패혈증 상황에서 TNF- α , IL-6는 초기에 상승하여 이후 감소한다고 알려져 있어, 본 연구에서는 초기 6시간까지만 측정을 하였지만, 생존 결과에서 보면 LPS를 이용한 내독소혈증 유발군에서 12시간에서 24시간 사이에 실험동물의 사망이 발생하는 점을 고려해 보면 향후에는 pro-inflammatory cytokine의 12시간 및 24시간째 농도를 측정하는 것이 필요하겠다.

결 론

내독소혈증을 유발한 마우스 모델에서 헤모팩신의 보충은 전신 염증성 반응을 줄이고 폐조직에서 폐 손상을 줄여 주며 생존율을 증가시켰다. 이 효과는 NF- κ B pathway의 억제와 밀접한 관련이 있다.

참고 문헌

1. Singer M, Deutschland C, Seymour C, Shanker-Hare M, Andante D, Bauer M, Ballroom R, EU ap. The third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3). JANA. 2016;315:801-810.
2. Ruddier A, Statz M, Singer M, Cellular processes in sepsis. Swiss Med Wily. 2008 Nov 1;138(43-44):629-634.
3. Hall MN, Levant S, Deferences CO. Trends in inpatient hospital deaths: National Hospital Discharge Survey, 2000-2010. NCHS data brief, no 118. Hyattsville: National Center for Health Statistics; 2013.
4. G. S. Martin, D. M. Mannino, S. Eaton, M. Moss, The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N. Engl. J. Med. 2003, 348, 1546-1554.
5. Dombrovskiy VY, Martin AA: Rapid increase in hospitalization and mortality rates for severe sepsis in the United States: a trend analysis from 1993 to 2003, Crit Care Med 2007;35:1244-1250.
6. Martin G, Mannino D, Eaton S, et al. The epidemiology of sepsis in the United States from 1979 through 2000. N Engl J Med. 2003;348:1546-1554.
7. Angus DC, Linde-Swirble T, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. Crit Care Med. 2001;29:1303-1310.

8. Padkin A, Goldfrad C, Brady AR, et al. Epidemiology of severe sepsis occurring in the first 24 hrs in intensive care units in England, Wales, and Northern Ireland. *Crit Care Med*. 2003;31:2332-2338.
9. Brun-Buisson C, Meshaka P, Pinton P, EPISEPSIS Study Group et al. EPISEPSIS: a reappraisal of the epidemiology and outcome of severe sepsis in French intensive care units. *Intensive Care Med*. 2004;30:580-588.
10. Finfer S, Bellomo R, Lipman J, et al. Adult-population incidence of severe sepsis in Australian and New Zealand intensive care units. *Intensive Care Med*. 2004;30:589-596.
11. Dong HP, Chen HW, Hsu C, et al. Previous heat shock treatment attenuates lipopolysaccharide-induced hyporesponsiveness of platelets in rats. *Shock* 2005;24: 239-244.
12. Angus DC, Linda-Zwirble WT, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care. *Crit Care Med* 2001;29:1303-1310.
13. Ferrer R, Artigas A, Levy MM, Edusepsis Study Group et al. Improvement in process of care and outcome after a multicenter severe sepsis educational program in Spain. *JAMA*. 2008;299:294-303.
14. Bone RC, Balk RA, Cerra FB et al. Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. *Chest* 1992; 101:1644-1655.
15. Bone RC. The pathogenesis of sepsis. *Ann Intern Med*.

1991;115:457–469

16. J. Cohen, The immunopathogenesis of sepsis. *Nature* 2002;420:885–891

17. Wilkman E, Kaukonen KM, Pettilä V, Kuitunen A, Varpula M. Association between inotrope treatment and 90-day mortality in patients with septic shock. *Acta Anaesthesiol Scand*. 2013;57:431–442.

18. Moynagh PN. The NF- κ B pathway. *J Cell Sci*. 2005;118:4589–92.

19. Bhatia M, Moochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. *J Pathol*. 2004;202:145–156.

20. Schwartz MD, Moore EE, Moore FA, et al. Nuclear factor- κ B is activated in alveolar macrophages from patients with acute respiratory distress syndrome. *Crit Care Med*. 1996;24:1285–1292.

21. Fan J, Ye RD, Malik AB. Transcriptional mechanisms of acute lung injury. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2001;281:L1037–L1050.

22. Suzuki T, Tada Y, Nishimura R, et al. Endothelial-to-mesenchymal transition in lipopolysaccharide-induced acute lung injury drives a progenitor cell-like phenotype. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*. 2016;310:L1185–L1198.

23. Rhodes A., Evans L.E., Alhazzani W., Levy M.M. et al. Surviving Sepsis Campaign: International Guidelines for Management of Sepsis and Septic Shock: 2016. *Intensive Care Medicine* 2017;43:304–377.

24. Levy MM, Fink MP: 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/SIS. International Sepsis Definitions Conference. Crit Care Med. 2003;31:1250–1256.
25. Ryter SW, Otterbein LE, Morse D, Choi AM. Heme oxygenase/carbon monoxide signaling pathways: regulation and functional significance. Mol Cell Biochem. 2002;234–235:249–263.
26. Ponka P. Cell biology of heme. Am J Med Sci. 1999;318:241–256.
27. Jung JY, Kwak YH, Kim KS, Kwon WY, Suh GJ. Change of hemopexin level is associated with the severity of sepsis in endotoxemic rat model and the outcome of septic patients. J Crit Care. 2015;30:525–530.
28. Schaer DJ, Buehler PW, Alayash AI, Belcher JD, Vercellotti GM. Hemolysis and free hemoglobin revisited: exploring hemoglobin and hemin scavengers as a novel class of therapeutic proteins. Blood. 2013;121:1276–1284.
29. Fortes GB, Alves LS, de Oliveira R, et al. Heme induces programmed necrosis on macrophages through autocrine TNF and ROS production. Blood. 2012;119:2368–2375.
30. Lin T, Kwak YH, Sammy F, et al. Synergistic inflammation is induced by blood degradation products with microbial toll– like receptor agonists and is blocked by hemopexin. J Infect Dis. 2010;202:624–632.

31. Larsen R, Gozzelino R, Jeney V, et al. A central role for free heme in the pathogenesis of severe sepsis. *Sci Transl Med*. 2010;2:51ra71.
32. Lam A, Vetat N, Matalon S, Aggarwal S. Role of heme in bromine-induced lung injury. *Ann N Y Acad Sci*. 2016;1374:105–110.
33. Chintagari NR, Jana S, Alayash AI. Oxidized ferric and ferryl forms of hemoglobin trigger mitochondrial dysfunction and injury in alveolar type i cells. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2016;55:288–298.
34. Aggarwal S, Lam A, Bolisetty S, et al. Heme attenuation ameliorates irritant gas inhalation-induced acute lung injury. *Antioxid Redox Signal*. 2016;24:99–112.
35. Ishiguro T, Imanishi K, Suzuki I. Hemopexin levels in mice. *Int J Immunopharmacol*. 1984;6:241–244.
36. Matute-Bello G, Downey G, Moore BB, et al. An official American Thoracic Society workshop report: features and measurements of experimental acute lung injury in animals. *Am J Respir Cell Mol Biol*. 2011;44:725–738.
37. Muller-Eberhard U. **Hemopexin**. *N Engl J Med* 1970;283:1090–1094.
38. S. Bhakdi, H. Bayley, A. Valeva, I. Walev, B. Walker, M. Kehoe, M. Palmer, Staphylococcal alpha-toxin, streptolysin-O, and Escherichia coli hemolysin: Prototypes of pore-forming bacterial cytolysins. *Arch. Microbiol*. 1996;165:73–79.
39. G. Silva, V. Jeney, A. Chora, R. Larsen, J. Balla, M. P. Soares,

Oxidized hemoglobin is an endogenous proinflammatory agonist that targets vascular endothelial cells. *J. Biol. Chem.* 2009;284:29582–29595.

40. Pamplona, A. Ferreira, J. Balla, V. Jeney, G. Balla, S. Epiphanio, A. Chora, C. D. Rodrigues, I. P. Gregoire, M. Cunha–Rodrigues, S. Portugal, M. P. Soares, M. M. Mota, Heme oxygenase–1 and carbon monoxide suppress the pathogenesis of experimental cerebral malaria. *Nat. Med.* 2007;13:703–710.

41. Balla G, Vercellotti GM, Muller–Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest.* 1991;64:648–655.

42. Vinchi F, Costa da Silva M, Ingoglia G, et al. Hemopexin therapy reverts heme–induced proinflammatory phenotypic switching of macrophages in a mouse model of sickle cell disease. *Blood.* 2016;127:473–486.

43. Lin T, Sammy F, Yang H, et al. Identification of hemopexin as an anti–inflammatory factor that inhibits synergy of hemoglobin with HMGB1 in sterile and infectious inflammation. *J Immunol.* 2012;189:2017–2022.

44. Baumann H, Jahreis GP, Gaines KC. Synthesis and regulation of acute phase plasma proteins in primary cultures of mouse hepatocytes. *J Cell Biol.* 1983;97:866–876.

45. De Maio A, Torres MB, Reeves RH. Genetic determinants influencing the response to injury, inflammation, and sepsis. *Shock.* 2005;23:11–17.

46. Zanotti–Cavazzoni SL, Goldfarb RD. Animal models of sepsis. *Crit*

Abstract

Introduction: Sepsis is a disease with high mortality rate and is causing great economic and social burden worldwide. Sepsis is also known to be one of the major cause of death to the next of cancer, acute cardiac death. Recent studies have shown that hemolysis occurs extensively during sepsis and free heme released through hemolysis can cause oxidation, inflammation, and tissue damage. Hemopexin is a protein that is released from hepatocytes. It's major role is known to remove the free heme in the manner of incorporating, and hemopexin has recently attracted attention as a candidate substance to reduce inflammation caused by heme. However, the role of hemopexin in sepsis and endotoxemia has not yet been elucidated. The aim of this study was to investigate whether hemopexin supplement, which is anticipated to have anti-inflammatory effects in endotoxemic mouse model, could reduce the systemic and pulmonary inflammatory response in mouse model.

Methods: Endotoxemia was induced using lipopolysaccharde (LPS) in male BALB/c mice weighing 20–23g. The dose of LPS was 10 mg/kg which was 75% mortality, and the dose of hemopexin supplement was set at 5 mg/kg. I performed survival experiments by dividing mice into three groups; control group, LPS group (LPS treated only), and

LPS+HPX group (HPX supplemented after LPS treated). In the control group, distilled water was administered intravenously and normal saline was administered intraperitoneally. In the other group, intraperitoneal injection of LPS was performed to induce endotoxemia in mice and 30 minutes later, intravenous injection of distilled water (LPS group), hemopexin (LPS+HPX group). Then, survival was monitored for 36 hours. Under the same circumstances and operations in the survival experiments, another experiment was performed. Mice were sacrificed at 0, 3, 6 hours by cardiac sampling, and serum tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6) and hemopexin concentrations were measured. In addition, lung tissues were harvested and analyzed for cytoplasmic inhibitor κ B- α (I- κ B- α), nuclear factor- κ B (NF- κ B), and the p65 subunit of NF- κ B (NF- κ B p65) were measured at 0, 3, 6 hours and the histological characteristics of each group were compared with hematoxylin and eosin staining and lung injury score at 6 hours. One way repeated measured analysis of variance was used to analyze the change of each item over time. The analysis of difference of each group by specific time period was analyzed using Mann-Whitney U post hoc test with bonferroni correction.

Results: As a result of the survival experiment, the control group was all alive, and the mortality rate was 63.6% in the LPS group and 9.1% in the LPS+HPX group. LPS+HPX group had significantly lower

mortality than LPS group. ($p < 0.05$) Serum levels of TNF- α and IL-6 were significantly lower in the LPS + HPX group than in the LPS group at 3 hours and 6 hours. ($p < 0.05$). The expression of cytoplasmic p-IkB- α and NF- κ B p65 in the LPS + HPX group was significantly higher than that in the LPS group. ($p = 0.017$) NF- κ B p65 binding activity and cytoplasmic p-IkB- α to IkB- α ratio were also significantly lower in the LPS+HPX group than in the LPS group. ($p = 0.002$). Lung injury scores at 6 hours were significantly lower in the LPS+HPX group than in the LPS group, and the LPS+HPX group showed less severe lung inflammation in Haematoxylin and eosin stain.

Conclusion: HPX supplementation was a protective effect of an endotoxemic mouse model of reducing systemic inflammation via inflammatory cytokine downregulation and attenuating histologic lung injury, thereby improving survival. These effects were associated with suppression of the NF-KB pathway

Key words: hemopexin, heme, endotoxemia, NF- κ B pathway, lung injury

Student Number: 2012-30526